



**Membranes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf. Isolement, purification et propriétés enzymatiques générales. Réactivité vis-à-vis de la désoxycorticostérone.**

Michel Satre

► **To cite this version:**

Michel Satre. Membranes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf. Isolement, purification et propriétés enzymatiques générales. Réactivité vis-à-vis de la désoxycorticostérone.. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1973. Français. NNT : . tel-00216050

**HAL Id: tel-00216050**

**<https://theses.hal.science/tel-00216050>**

Submitted on 24 Jan 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# THÈSE

*présentée*

**A L'UNIVERSITÉ SCIENTIFIQUE ET MÉDICALE DE GRENOBLE**

*pour l'obtention du grade*

**DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES**

*P A R*

**Michel SATRE**



**Membranes des mitochondries de cortex surrénal de bœuf.**

**Isolement, purification et propriétés enzymatiques générales.**

**Réactivité vis-à-vis de la désoxycorticostérone.**

*Soutenue le 2 Mai 1973, devant la Commission d'Examen*

**M. G. DESSAUX**

*Président*

**Mlle D. GAUTHERON**

**MM. S. IDELMAN**

**P. VIGNAIS**

*Examineurs*

Président : Monsieur Michel SOUTIF  
Vice-Président : Monsieur Gabriel CAU

PROFESSEURS TITULAIRES.

MM. ANGLES D'AURIAC Paul	Mécanique des fluides
ARNAUD Georges	Clinique des maladies infectieuses
ARNAUD Paul	Chimie
AUBERT Guy	Physique
AVANT Yves	Physique approfondie
Mme BARBIER Marie-Jeanne	Electrochimie
MM. BARBIER Jean-Claude	Physique Expérimentale
BARBIER Reynold	Géologie appliquée
BARJON Robert	Physique Nucléaire
BARNOUD Fernand	Biosynthèse de la cellulose
BARRA Jean-René	Statistiques
BARRIE Joseph	Clinique chirurgicale
BENOIT Jean	Radioélectricité
BERNARD Alain	Mathématiques pures
BESSON Jean	Electrochimie
BEZES Henri	Chirurgie générale
BLAMBERT Maurice	Mathématiques pures
BOLLIET Louis	Informatique (IUT B)
BONNET Georges	Electrotechnique
BONNET Jean-Louis	Clinique ophtalmologique
BONNET-EYMARD Joseph	Pathologie médicale
BONNIER Etienne	Electrochimie Electrometallurgie
BOUCHERLE André	Chimie et Toxicologie
BOUCHEZ Robert	Physique nucléaire
BOUSSARD Jean-Claude	Mathématiques appliquées
BRAVARD Yves	Géographie
BRISSENEAU Pierre	Physique du Solide
BUYLE-BODIN Maurice	Electronique
CABANAC Jean	Pathologie chirurgicale
CABANEL Guy	Clinique rhumatologique et hydrologie
CALAS François	Anatomie
CARRAZ Gilbert	Biologie animale et pharmacodynamie
CAU Gabriel	Médecine légale et Toxicologie
CAUQUIS Georges	Chimie organique
CHABAUTY Claude	Mathématiques pures
CHARACHON Robert	Oto-Rhino-Laryngologie
CHATEAU Robert	Thérapeutique
CHENE Marcel	Chimie papetière
COEUR André	Pharmacie chimique
CONTAMIN Robert	Clinique gynécologique
COUDERC Pierre	Anatomie Pathologique
CRAVA Antoine	Mécanique

Mme	DEBELMAS Anne-Marie	Matière médicale
MM.	DEBELMAS Jacques	Géologie générale
	DEGRANGE Charles	Zoologie
	DESRE Pierre	Métallurgie
	DESSAUX Georges	Physiologie animale
	DODU Jacques	Mécanique appliquée
	DOLIQUE Jean-Michel	Physique des plasmas
	DREYFUS Bernard	Thermodynamique
	DUCROS Pierre	Cristallographie
	DUGOIS Pierre	Clinique de Dermatologie et Syphiligraphie
	FAU René	Clinique neuro-psychiatrique
	FELICI Noël	Electrostatique
	GAGNAIRE Didier	Chimie physique
	GALLISSOT François	Mathématiques pures
	GALVANI Octave	Mathématiques pures
	GASTINEL Noël	Analyse numérique
	GEINDRE Michel	Electroradiologie
	GERBER Robert	Mathématiques pures
	GIRAUD Pierre	Géologie
	KLEIN Joseph	Mathématiques pures
Mme	KOFLER Lucie	Botanique et Physiologie végétale
MM.	KOSZUL Jean-Louis	Mathématiques pures
	KRAVTCHENKO Julien	Mécanique
	KUNTZMANN Jean	Mathématiques Appliquées
	LACAZE Albert	Thermodynamique
	LACHARME Jean	Biologie végétale
	LAJZEROWICZ Joseph	Physique
	LATREILLE René	Chirurgie générale
	LATURAZE Jean	Biochimie pharmaceutique
	LAURENT Pierre	Mathématiques Appliquées
	LEDRU Jean	Clinique médicale B
	LLIBOUTRY Louis	Géophysique
	LOUP Jean	Géographie
Mlle	LUTZ Elisabeth	Mathématiques pures
	MALGRANGE Bernard	Mathématiques pures
	MALINAS Yves	Clinique obstétricale
	MARTIN-NOEL Pierre	Sémiologie médicale
	MASSEPORT Jean	Géographie
	MAZARE Yves	Clinique médicale A
	MICHEL Robert	Minéralogie et Pétrographie
	MOURIQUAND Claude	Histologie
	MOUSSA André	Chimie nucléaire
	NEEL Louis	Physique du Solide
	OZENDA Paul	Botanique
	PAUTHENET René	Electrotechnique
	PAYAN Jean-Jacques	Mathématiques pures
	PEBAY-PEYROULA Jean-Claude	Physique
	PERRET René	Servomécanismes
	PILLET Emile	Physique industrielle
	RASSAT André	Chimie systématique
	RENARD Michel	Thermodynamique
	REULOS René	Physique industrielle
	RINALDI Renaud	Physique



MM. ROGET Jean	Clinique de pédiatrie et de puériculture
SANTON Lucien	Mécanique
SEIGNEURIN Raymond	Microbiologie et Hygiène
SENGEL Philippe	Zoologie
SILBERT Robert	Mécanique des fluides
SOUTIF Michel	Physique générale
TANCHE Maurice	Physiologie
TRAYNARD Philippe	Chimie générale
VAILLAND François	Zoologie
VALENTIN Jacques	Physique nucléaire
VAUQUOIS Bernard	Calcul électronique
Mme VERAÏN Alice	Pharmacie galénique
M. VERAÏN André	Physique
Mme VEYRET Germaine	Géographie
MM. VEYRET Paul	Géographie
VIGNAIS Pierre	Biochimie médicale
VOCCOZ Jean	Physique nucléaire théorique.

#### PROFESSEURS ASSOCIES.

MM. BULLEMER Bernhard	Physique
HANO JUN-ICHI	Mathématiques pures
STEPHENS Michaël	Mathématiques appliquées

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE.

MM. BEAUDOING André	Pédiatrie
Mme BERTRANDIAS Françoise	Mathématiques pures
MM. BERTRANDIAS Jean-Paul	Mathématiques appliquées
BIAREZ Jean-Pierre	Mécanique
BONNETAIN Lucien	Chimie minérale
Mme BONNIER Jane	Chimie générale
MM. CARLIER Georges	Biologie végétale
COHEN Joseph	Electrotechnique
COUMES André	Radioélectricité
DEPASSEL Roger	Mécanique des fluides
DEPORTES Charles	Chimie minérale
GAUTHIER Yves	Sciences biologiques
GAVEND Michel	Pharmacologie
GERMAIN Jean-Pierre	Mécanique
GIDON Paul	Géologie et Minéralogie
GLENAT René	Chimie organique
HACQUES Gérard	Calcul numérique
JANIN Bernard	Géographie
Mme KAHANE Josette	Physique
MM. MULLER Jean-Michel	Thérapeutique
PERRIAUX Jean-Jacques	Géologie et minéralogie
POULOUJADOFF Michel	Electrotechnique
REBECQ Jacques	Biologie (CUS)
REVOL Michel	Urologie
REYMOND Jean-Charles	Chirurgie générale
ROBERT André	Chimie papetière.
DE ROUGEMONT Jacques	Neurochirurgie

MM. SARRAZIN Roger	Anatomie et chirurgie
SARROT-REYNAULD Jean	Géologie
SIBILLE Robert	Construction Mécanique
SIROT Louis	Chirurgie générale
Mme SOUTIF Jeanne	Physique générale.

MAITRES DE CONFERENCES ET MAITRES DE CONFERENCES AGREGES.

Mlle AGNIUS-DELOD Claudine	Physique pharmaceutique
ALARY Josette	Chimie analytique
MM. AMBLARD Pierre	Dermatologie
AMBROISE-THOMAS Pierre	Parasitologie
ARMAND Yves	Chimie
BEGUIN Claude	Chimie organique
BELORIZKY Elie	Physique
BENZAKEN Claude	Mathématiques Appliquées
BILLET Jean	Géographie
BLIMAN Samuel	Electronique (EIE)
BLOCH Daniel	Electrotechnique
Mme BOUCHE Liane	Mathématiques (CUS)
MM. BOUCHET Yves	Anatomie
BOUVARD Maurice	Mécanique des fluides
BRODEAU François	Mathématiques (IUT B)
BRUGEL Lucien	Energétique
BUISSON Roger	Physique
BUTEL Jean	Orthopédie
CHAMBAZ Edmond	Biochimie médicale
CHAMPETIER Jean	Anatomie et organogénèse
CHIAVERINA Jean	Biologie appliquée (EFP)
CHIBON Pierre	Biologie animale
COHEN-ADDAD Jean-Pierre	Spectrométrie physique
COLOMB Maurice	Biochimie médicale
CONTE René	Physique
COULOMB Max	Radiologie
CROUZET Guy	Radiologie
DURAND Francis	Métallurgie
DUSSAUD René	Mathématiques (CUS)
Mme ETERRADOSSI Jacqueline	Physiologie
MM. FAURE Jacques	Médecine légale
GENSAC Pierre	Botanique
GIDON Maurice	Géologie
GRIFFITHS Michaël	Mathématiques Appliquées
GROULADE Joseph	Biochimie médicale
HOLLARD Daniel	Hématologie
HUGONOT Robert	Hygiène et Médecine préventive
IDELMAN Simon	Physiologie animale
IVANES Marcel	Electricité
JALBERT Pierre	Histologie
JOLY Jean-René	Mathématiques pures
JOUBERT Jean-Claude	Physique du Solide
JULLIEN Pierre	Mathématiques pures.

MM. KAHANE André	Physique générale
KUHN Gérard	Physique
LACOME Jean-Louis	Physique
Mme LAJZEROWICZ Jeannine	Physique
MM. LANCIA Roland	Physique atomique
LE JENTER Noël	Electronique
LEROY Philippe	Mathématiques
LOISEAUX Jean-Marie	Physique Nucléaire
LONGUEUE Jean-Pierre	Physique Nucléaire
LUU DUC Cuong	Chimie Organique
MACHE Régis	Physiologie végétale
MAGNIN Robert	Hygiène et Médecine préventive
MARECHAL Jean	Mécanique
MARTIN-BOUYER Michel	Chimie (CUS)
MAYNARD Roger	Physique du Solide
MICHOULIER Jean	Physique (I.U.T. "A")
MICOUX Max	Maladies infectieuses
MOREAU René	Hydraulique (INP)
NEGRE Robert	Mécanique
PARAMELLE Bernard	Pneumologie
PECCOUX François	Analyse (IUT B)
PEFFEN René	Métallurgie
PELMONT Jean	Physiologie animale
PERRET Jean	Neurologie
PERRIN Louis	Pathologie expérimentale
PFISTER Jean-Claude	Physique du Solide
PHÉLIP Xavier	Rhumatologie
Mlle PIERV Yvette	Biologie animale
MM. RACHAIL Michel	Médecine interne
RACINET Claude	Gynécologie et obstétrique
RENAUD Maurice	Chimie
RICHARD Lucien	Botanique
Mme RINAUDO Marguerite	Chimie macromoléculaire
MM. ROMIER Guy	Mathématiques (IUT B)
SHIM Jean-Claude	Chimie générale
STIEGLITZ Paul	Anesthésiologie
STOEBNER Pierre	Anatomie pathologique
VAN CUTSEM Bernard	Mathématiques Appliquées
VEILLON Gérard	Mathématiques Appliquées (INP)
VIALON Pierre	Géologie
VOOG Robert	Médecine interne
VIROUSOS Constantin	Radiologie
ZADWORYN François	Electronique

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES.

MM. BOUDOURIS Georges	Radioélectricité
CHEEKE John	Thermodynamique
GOLDSCHMIDT	Mathématiques pures
VACOUD Mahmoud	Médecine légale

CHARGES DE FONCTIONS DE MAITRES DE CONFERENCES.

Mme BERIEL Hélène	Physiologie
Mme RENAUDET Jacqueline	Microbiologie.

Fait le 2 avril 1973.

## SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION GENERALE.</u>	1
<u>CHAPITRE I : METHODES.</u>	
1. <u>MATERIEL BIOLOGIQUE.</u>	6
1.1. Préparation des mitochondries.	
1.2. Préparation des microsomes.	
2. <u>PREPARATIONS ET DOSAGES DIVERS.</u>	8
2.1. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique.	
2.2. Dosage des protéines.	
2.3. Dosage des cytochromes P-450 et P-420.	
2.4. Préparation de la métyrapone et du métyrapol tritiés.	
2.5. Mesures de radio-activité.	
3. <u>TESTS ENZYMATIQUES.</u>	15
3.1. Cytochrome c oxydase.	
3.2. Monoamine oxydase.	
3.3. NADPH cytochrome c réductase.	
3.4. Malate déshydrogénase.	
3.5. Adényl cyclase.	
3.6. 11 $\beta$ -hydroxylase.	
3.7. 21-hydroxylase.	
4. <u>FIXATION DES STEROIDES ET DES INHIBITEURS.</u>	24
4.1. Préincubation des mitochondries.	
4.2. Mesure de la fixation des stéroïdes.	
4.3. Décomposition des courbes de fixation en deux classes de sites.	
4.4. Fixation du métyrapol et de la métyrapone.	

## CHAPITRE II : PROPRIETES GENERALES DES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

1. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DU CORTEX SURRENAL. 32
2. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES MITOCHONDRIES. 33
3. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DES MITOCHONDRIES. 35
  - 3.1. Utilisation de l'oxygène par les mitochondries.
  - 3.2. Affinité pour l'oxygène de la chaîne respiratoire et de la chaîne d'hydroxylation.
  - 3.3. Interaction entre la phosphorylation et l'hydroxylation.
  - 3.4. Cytochromes mitochondriaux.
  - 3.5. Estimation de la densité des mitochondries.

## CHAPITRE III : SEPARATION DES MEMBRANES DES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

1. INTRODUCTION. 44
  - 1.1. Méthodes de séparation des membranes mitochondriales.
  - 1.2. Localisations enzymatiques.
2. SEPARATION DES MEMBRANES DE MITOCHONDRIES DE CORTEX  
SURRENAL PAR LA METHODE DE PARSONS. 47
3. CARACTERISTIQUES DES MEMBRANES EXTERNES ET INTERNES DES  
MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL. 48
  - 3.1. Caractéristiques biochimiques.
  - 3.2. Caractéristiques morphologiques.
  - 3.3. Localisation submitochondriale du système de 11 $\beta$ -hydroxylation et du cytochrome P-450.
  - 3.4. Essai de purification de la membrane interne.
  - 3.5. Discussion.

4. PREPARATION DE MEMBRANES INTERNES PURIFIEES :  
TRAITEMENT PAR LA DIGITONINE. 57

- 4.1. Activités enzymatiques.
- 4.2. Action de la digitonine sur la structure des mitochondries.
- 4.3. Discussion.

CHAPITRE IV : INTERACTION DES STEROIDES ET DES INHIBITEURS  
DE LA 11 $\beta$ -HYDROXYLATION (METYRAPONE, METYRAPOL)  
AVEC LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE  
BOEUF.

A - FIXATION DE DESOXYCORTICOSTERONE SUR LES MITOCHONDRIES  
DE CORTEX SURRENAL.

1. MESURES DIRECTES DE LA FIXATION DE <sup>14</sup>C-DESOXYCORTICOS-  
TERONE. 63

2. INTERACTION SPECTRALE. 64

3. FIXATION DE DESOXYCORTICOSTERONE : EFFET INHIBITEUR  
DE LA METYRAPONE ET DU METYRAPOL. 67

- 3.1. Mesures directes.
- 3.2. Equilibre de fixation d'un ligand en présence d'un inhibiteur compétitif.
- 3.3. Interaction spectrale.
- 3.4. Mesure de la désoxycorticostérone et de la corticostérone intramitochondriale.

4. DISCUSSION. 73

B - INTERACTION DE LA METYRAPONE ET DU METYRAPOL AVEC LES  
MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

1. <u>PROPRIETES INHIBITRICES DU METYRAPOL SUR LA 11<math>\beta</math>-HYDRO-XYLATION.</u>	76
2. <u>CINETIQUE DE FIXATION DU METYRAPOL.</u>	77
3. <u>FIXATION DU METYRAPOL : MESURES A L'EQUILIBRE.</u>	80
3.1. Mesures directes.	
3.2. Titration spectrale.	
3.3. Inactivation thermique. Corrélation avec les effets spectraux.	
3.4. Effet de la température sur la fixation du métyrapol.	
3.5. Effet du pH sur la fixation de métyrapol.	
4. <u>ACTION DU CYCLOHEXYLISOCYANIDE SUR LA FIXATION DU METYRAPOL.</u>	85
4.1. Compétitions spectrales du cyclohexylisocyanide et du métyrapol.	
4.2. Inhibition par le cyclohexylisocyanide de la fixation du métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal.	
5. <u>INHIBITION DE LA FIXATION DU METYRAPOL PAR DIVERS STEROIDES.</u>	
5.1. Interaction spectrale du métyrapol et de la désoxycorticostérone.	
5.2. Inhibition par les stéroïdes de la fixation du <sup>3</sup> H-métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal.	
6. <u>FIXATION DU METYRAPOL SUR LES MEMBRANES EXTERNES ET INTERNES DES MITOCHONDRIES ET SUR LES MICROSOMES DU CORTEX SURRENAL.</u>	90
7. <u>FIXATION DU METYRAPOL SUR LES MITOCHONDRIES ET LES MICROSOMES DE FOIE DE RAT.</u>	91



8. <u>FIXATION DE LA METYRAPONE SUR LES MITOCHONDRIES DE</u> <u>CORTEX SURRENAL.</u>	91
9. <u>DISCUSSION</u>	92
<u>CONCLUSIONS GENERALES.</u>	97
<u>RESUME</u>	100
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	103

Je remercie Monsieur DESSAUX, d'avoir bien voulu accepter de présider la Commission d'Examen de cette thèse.

Je remercie sincèrement Mademoiselle GAUTHERON, qui m'a toujours conseillé avec bienveillance, d'avoir bien voulu participer à ce jury.

Le concours et la compétence de Monsieur IDELMAN, qui a procédé aux examens en microscopie électronique essentiels pour ce travail, m'ont été précieux. Je le remercie d'avoir accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Ces recherches ont été effectuées sous la direction de Monsieur VIGNAIS dans le laboratoire de Biochimie du Département de Recherche Fondamentale du Centre d'Etudes Nucléaires. Je veux profiter de l'occasion qui m'est offerte pour dire combien ses conseils et son exemple constant m'ont guidé. C'est grâce au soutien et à l'attention qu'il m'a si souvent apportés que je présente aujourd'hui ce travail. Je lui exprime ma gratitude.

Enfin, je ne saurais oublier la sympathie et l'amitié que j'ai trouvées auprès de toutes les personnes du laboratoire. Je les remercie de l'aide effective qu'ils m'ont prêtée.

## INTRODUCTION GENERALE

Les mitochondries de toutes les cellules réalisent le couplage des réactions d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire avec la synthèse d'adénosinetriphosphate (ATP) : ce sont les réactions de l'oxydation phosphorylante. Dans le cortex surrénal, les mitochondries, en plus de leur fonction commune, accomplissent une partie spécifique de la biosynthèse des corticostéroïdes (1)-(2)-(16)-(18).

Les caractéristiques générales de l'élaboration des corticostéroïdes par le cortex surrénal sont connues. Les études détaillées des réactions individuelles et des étapes de contrôle sont en cours. Le cholestérol est le précurseur commun des divers stéroïdes sécrétés par le cortex surrénal. Il est transformé par une série complexe de réactions qui commencent par le clivage d'une partie de sa chaîne latérale ; ultérieurement une deshydrogénation, une isomérisation, suivies de plusieurs hydroxylations conduisent aux stéroïdes majeurs du cortex surrénal : l'aldostérone, la corticostérone et le cortisol. La Fig. 1 schématise la biosynthèse de la corticostérone. La corticotrophine (ACTH) est l'hormone qui stimule la biosynthèse des stéroïdes provoquant une sécrétion accrue de corticostérone et de cortisol. Bien que la production d'aldostérone soit augmentée par l'ACTH, d'autres facteurs sont plus importants dans le contrôle de la production de ce stéroïde.

Un des aspects les plus remarquables de la biosynthèse est la localisation subcellulaire des diverses réactions conduisant du cholestérol aux corticostéroïdes. Elle a été déterminée à partir de fractionnements subcellulaires par centrifugation différentielle. Dans le cytoplasme sont localisées la deshydrogénase et l'isomérase, dans les microsomes, les systèmes de 17 $\alpha$ -hydroxylation et 21-hydroxylation, enfin les mitochondries assurent le clivage de la chaîne latérale du cholestérol (20 $\alpha$ - et 22-hydroxylations), et possèdent les systèmes de 11 $\beta$ - et 18-hydroxylations.

Ces multiples localisations enzymatiques imposent un véritable cheminement intracellulaire des corticostéroïdes au cours de leurs transformations (Fig. 2).

Toutes les réactions d'hydroxylation des stéroïdes utilisent de l'oxygène moléculaire et du NADPH. La figure 3 montre par exemple la 11 $\beta$ -hydroxylation de la désoxycorticostérone.

En 1958, un pigment capable de se combiner avec l'oxyde de carbone avait été mis en évidence dans les microsomes de foie de rat (3). Ce n'est qu'en 1964 que Omura et Sato (4)-(5) montrèrent que le pigment inconnu était une hémoprotéine, et en raison de l'absorption à 450 nm du complexe avec l'oxyde de carbone, ils l'appelèrent : cytochrome P-450.

En 1964 également, Harding et al. (6)-(8) ont observé que les mitochondries de cortex surrénal avaient un contenu élevé en cytochrome P-450. La réaction de 11 $\beta$ -hydroxylation est catalysée par le cytochrome P-450 mitochondrial car elle est inhibée par l'oxyde de carbone et l'intensité de l'inhibition est proportionnelle à la concentration du cytochrome P-450 complexé avec l'oxyde de carbone (7). Le système de 11 $\beta$ -hydroxylation est multienzymatique, il comprend trois protéines : une NADPH flavoprotéine réductase, une protéine à fer non-hémunique : l'adrénodoxine, et le cytochrome P-450 (1)-(9)-(10). Dans les mitochondries isolées de cortex surrénal, le NADPH est un mauvais donneur d'équivalents réducteurs, par contre les intermédiaires du cycle de Krebs : malate, isocitrate, succinate, sont très efficaces. Ce fait avait suggéré très tôt l'existence d'interactions entre l'oxydation phosphorylante et l'hydroxylation des stéroïdes (11)-(12).

Les caractéristiques originales des mitochondries de cortex surrénal en ont fait un matériel d'étude pour de nombreuses équipes qui examinent leurs propriétés associées à leur rôle important dans l'hydroxylation des stéroïdes. Dans chaque chapitre de ce travail, les résultats seront présentés et discutés à la lumière de ces autres travaux.

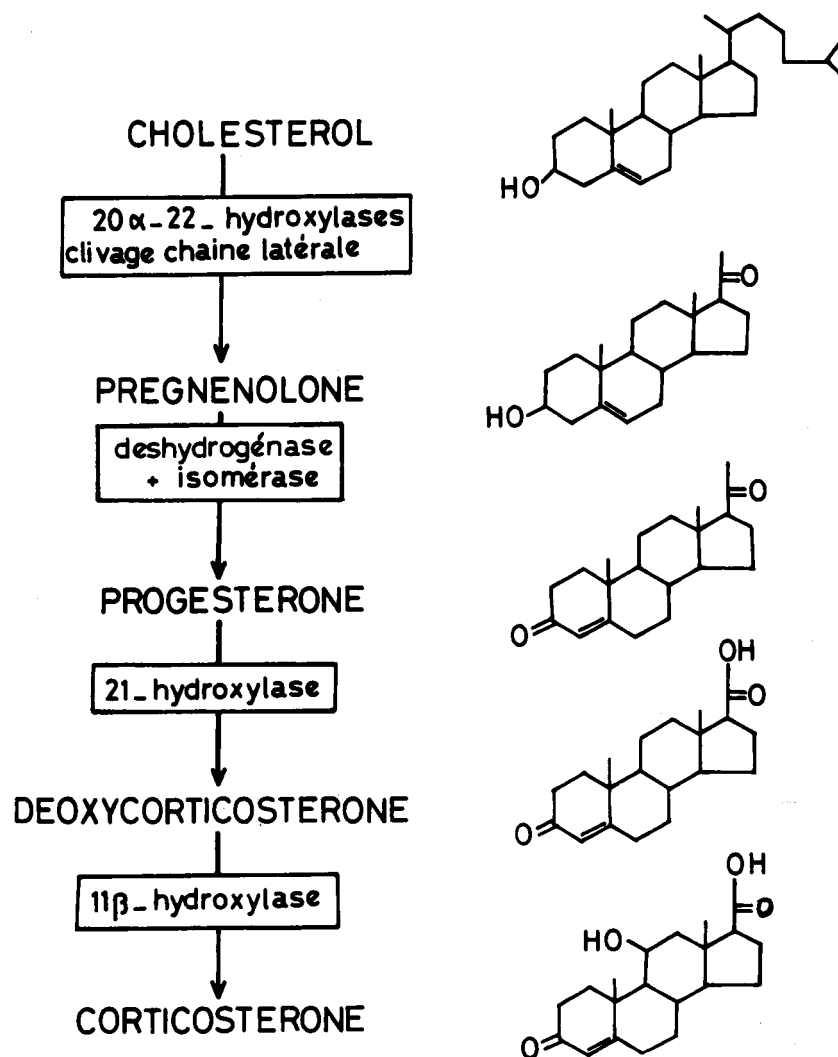


Fig. 1. Schéma des réactions de biosynthèse de la corticostérone.

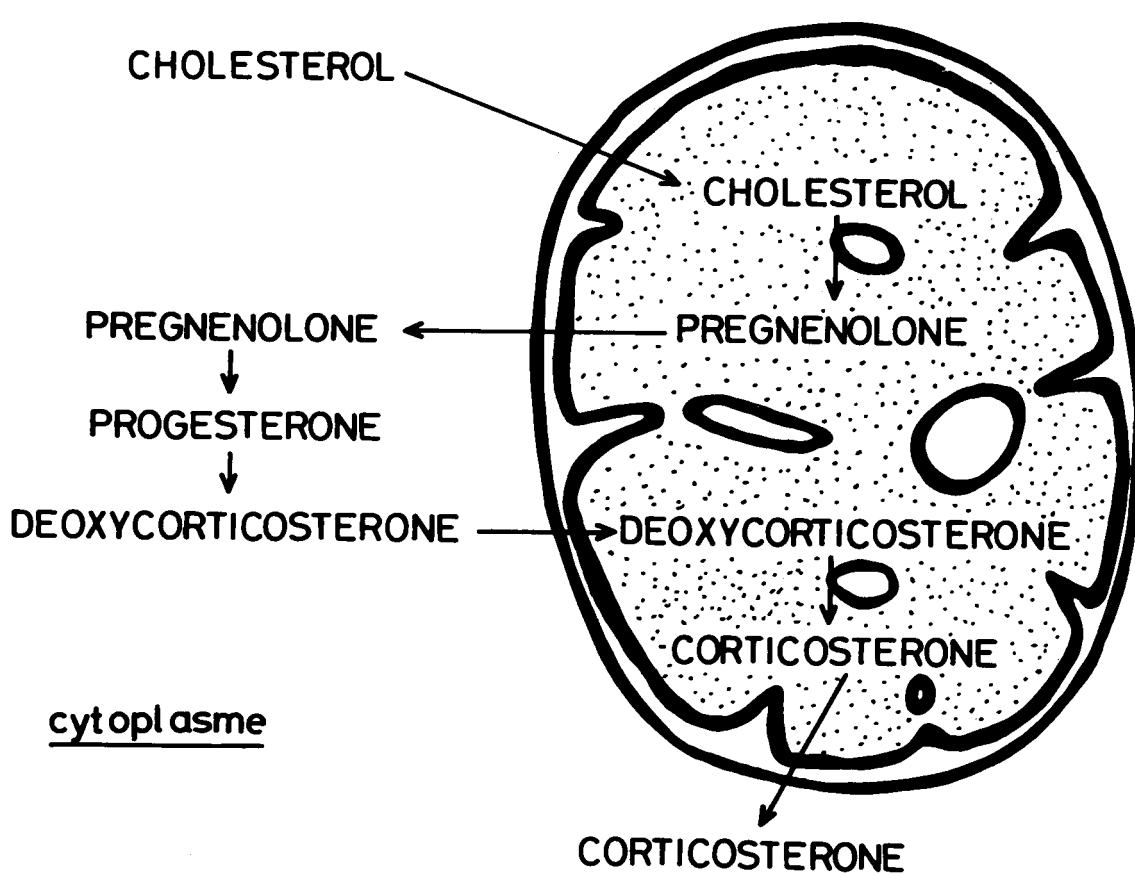


Fig. 2. Cheminement intracellulaire des stéroïdes lors de leur biosynthèse.

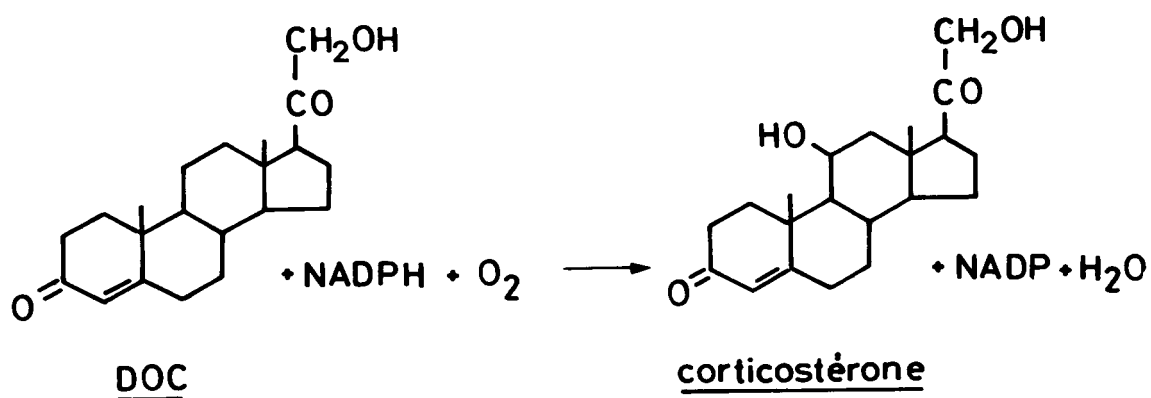


Fig. 3. Réaction de 11β-hydroxylation de la désoxycorticostérone.

Ce travail entre dans le cadre de recherches concernant la spécialisation "stéroïdique" des mitochondries de cortex surrénal, et portant sur leur équipement en systèmes membranaires de transport requis pour l'hydroxylation.

Il convenait, en particulier, de déterminer si la prise en charge de la désoxycorticostérone par les mitochondries, procédait par un système d'échange-diffusion, ou bien par une fixation nette, mais spécifique, de la désoxycorticostérone sur les membranes mitochondriales. Dans ce but, on a tout d'abord cherché la localisation submitochondriale précise du cytochrome P-450 et du système de 11 $\beta$ -hydroxylation, avant d'analyser les interactions de la désoxycorticostérone et des inhibiteurs de la 11 $\beta$ -hydroxylation avec les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Dans une première partie (chapitre II), seront brièvement exposées les propriétés générales des mitochondries de cortex surrénal de boeuf illustrant leur dualité fonctionnelle : respiration, phosphorylation, hydroxylation, équipement en cytochromes ...

Dans une seconde partie (chapitre III) sera présentée une étude parallèle des caractéristiques morphologiques et enzymatiques des membranes mitochondriales isolées externes et internes. Ces résultats ont permis de déterminer la localisation submitochondriale exacte dans la membrane interne du système de 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes et du cytochrome P-450 mitochondrial.

Dans une troisième partie (chapitre IV) sera étudiée la spécificité de la fixation sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf des corticostéroïdes et plus spécialement de la désoxycorticostérone ainsi que celle d'inhibiteurs compétitifs classiques de la 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes : la métyrapone et son alcool correspondant : le métyrapol.

# ABREVIATIONS

3',5' - AMP	adénosine 3',5' monophosphate cyclique.
AMP, ADP, ATP	adénosine 5'- mono -, di -, triphosphate.
DOC	désoxycorticostérone.
NAD, NADH	nicotinamide adénine dinucléotide, oxydé et réduit.
NADP, NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, oxydé et réduit.
HEPES	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine N'-2-éthane sulfonique.
Tris	Tris (hydroxyméthyl) - aminométhane.

-----

nm	nanomètre ( $10^{-9}$ m).
nmole	nanomole ( $10^{-9}$ mole).
pmole	picomole ( $10^{-12}$ mole).



PROVENANCE DES REACTIFS PARTICULIERS.

Produits non marqués.

Air Liquide	: oxyde de carbone (99.995 %)
Boehringer	: enzymes, coenzymes, cytochrome c
Fluka	: stéroïdes, cyclohexylisocyanide
Sigma	: L - malate, succinate, sérum albumine bovine (fraction V)
Calbiochem	: digitonine, HEPES.

Produit non commercial.

Ciba	: métyrapone (metopirone <sup>R</sup> )
------	---

Produits radio-actifs.

CEA, France	: <sup>14</sup> C - progestérone
	: <sup>3</sup> H - désoxycorticostérone
	: <sup>3</sup> H - borohydrure de sodium
	: <sup>32</sup> P - ATP.
New England	: <sup>14</sup> C - désoxycorticostérone
Nuclear	: <sup>14</sup> C - tryptamine.
(Allemagne)	

# CHAPITRE I

## METHODES

### 1. MATERIEL BIOLOGIQUE.

#### 1.1. Préparation des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Les mitochondries de cortex surrénal de boeuf sont obtenues par centrifugation différentielle d'un homogénat en milieu saccharose isotonique (19).

Les corticosurrénales sont prélevées rapidement après la mort de l'animal.\* En pratique, il n'est pas possible d'obtenir les glandes moins de vingt minutes après l'abattage. Les glandes, libérées des tissus graisseux adjacents sont déposés dans un récipient rempli de glace et apportées au laboratoire en général dans un délai d'une heure après la mort de l'animal.

Toutes les opérations ultérieures sont conduites en chambre froide (0°-4°). Le protocole de préparation décrit, correspond à un ensemble de quatre glandes.

Quatre glandes sont partagées longitudinalement avec un scalpel. La médullo-surrénale, partie centrale marron clair, est découpée soigneusement en totalité et rejetée. Des portions de la zone réticulée du cortex immédiatement adjacente à la médullaire sont sans doute rejetées au cours de cette opération, mais il est important de bien ôter toute la médullaire qui contient de nombreux enzymes hydrolytiques (protéinases, phospholipases ...). Les glandes déméduillées sont rincées dans un bécher contenant 100 ml du milieu suivant refroidi à 0° : saccharose 0,25M - sérum albumine 0,5 % (bovine, fraction 5, Sigma, USA) - Tris-HCl 0,004M - pH final : 7,4. Milieu : ST-BSA.

De petits lambeaux de cortex sont raclés et placés dans 100 ml de ST-BSA à 0°.

\* Je remercie le personnel des abattoirs de la ville de Grenoble, et particulièrement Monsieur Fournier, pour les facilités qu'ils m'ont toujours accordé lors de la collecte des glandes surrénales.

La plus grande partie du tissu appartient à la zone fasciculée et la zone réticulée, la zone glomérulée, peu épaisse, adhère fortement à la capsule. Les fragments de cortex provenant des quatre glandes, au moins 20 g de poids humide, sont rincés une fois par 100 ml de ST-BSA et remis en suspension dans 100 ml de ST-BSA. La suspension est transférée dans un homogénéiseur en verre de Potter-Elvehjem ayant un jeu d'environ 0,2 mm avec son piston en téflon. (Arthur Thomas, Phila., Pa., USA). Le piston est entraîné par un moteur à 1500-2000 tours par minute. Trois passages aller-retour permettent d'obtenir l'homogénat final. Celui-ci dilué avec 200 ml de ST-BSA est rapidement centrifugé dans une centrifugeuse Sorvall S1 à 1000 g pendant 10 minutes. Le culot est rejeté : il contient les noyaux, les cellules non éclatées et les hématies. Le surnageant est centrifugé à 8000 g pendant 15 minutes pour sédimenter la fraction mitochondriale. Le surnageant résultant est rejeté ou, éventuellement, conservé pour préparer les microsomes. Les parois des tubes à centrifuger sont essuyées avec du papier filtre pour éliminer les globules graisseux adhérents. Les culots sont remis en suspension dans 300 ml de ST-BSA et soumis à une centrifugation de 15 minutes à 9000 g. Les culots sont remis en suspension dans 150 ml de ST-BSA et centrifugés à 10000 g pendant 15 minutes. Les culots sont remis en suspension dans 70 ml de ST-BSA et centrifugés à 10000 g pendant 15 minutes.

Les culots mitochondriaux sont finalement homogénéisés dans un petit volume de saccharose 0,25M, Tris-HCl 0,002M, pH 7,4. La concentration en protéine est 50 à 70 mg/ml. Quatre glandes fournissent environ 160 mg de protéine mitochondriale soit un rendement d'environ 0,8 % du poids humide du tissu.

#### 1.2. Préparation des microsomes de cortex surrénal de boeuf.

Le premier surnageant post-mitochondrial est centrifugé 20 minutes à 15000 g pour éliminer les mitochondries légères et les fragments mitochondriaux.

Le surnageant est centrifugé 45 minutes à 105 000 g (centrifugeuse Spinco, rotor 30, 30 000 rpm). Le surnageant est rejeté et le culot microsomal, rosé et translucide, est homogénéisé vigoureusement dans un petit volume de saccharose 0,25M, Tris-HCl 0,002M, pH 7,4. La concentration en protéine est 40 à 60 mg/ml. Le cortex de quatre glandes fournit environ 200 mg de protéine microsomale.

## 2. PREPARATIONS ET DOSAGES DIVERS.

### 2.1. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique.

Deux méthodes ont été utilisées pour les examens :

- inclusion dans la résine des échantillons fixés et déshydratés.
- coloration négative par le phosphotungstate de potassium.

#### a) Inclusions.

La préparation des échantillons a été réalisée d'après les techniques décrites dans les ouvrages de Kay (20) et de Sjöstrand (21).

#### Fixation :

Une double fixation glutaraldéhyde-oxyde d'osmium est utilisée. Actuellement, cette technique est décrite comme une des meilleures méthodes de routine pour la préparation des inclusions.

Dans un tube à centrifuger, un faible volume de matériel (0,1 ml contenant au moins 1 mg de protéine) est dilué par environ 5 ml de glutaraldéhyde 1,5 % dans du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4.

Après 30 minutes au moins à 0°, la suspension est centrifugée. Le temps de centrifugation et la force centrifuge sont choisis pour ne pas trop tasser le culot (par exemple, pour les mitochondries et les membranes internes mitochondriales 5000 g et 10 minutes). Le culot est rincé deux fois par du tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 et découpé en petits fragments (1/2 mm de côté environ). Ces derniers peuvent alors être conservés à 0° pour terminer le traitement ultérieurement.

Les échantillons sont ensuite fixés une heure à 0° par 1 ml de mélange :

{	Oxyde d'osmium 4 % dans l'eau distillée .....	1 volume
	Tampon phosphate de sodium .....	1 volume
	0,2 M pH 7,3	

### Deshydratation.

La deshydratation est effectuée à la température ambiante par une série de bains successifs, dans des tubes bouchés. Pour des éléments subcellulaires, un plan typique est :

Ethanol - eau 30 % .....	2 minutes (répété une fois)
Ethanol - eau 50 % .....	2 minutes
Ethanol - eau 70 % .....	5 minutes
Ethanol - eau 90 % .....	5 minutes
Ethanol absolu .....	10 minutes (répété une fois)
Oxyde de propylène .....	10 minutes (répété deux fois)

Des temps de deshydratation plus longs sont nécessaires pour des spécimens moins perméables, par exemple des fragments de tissus.

Imprégnation par la résine et polymérisation.

L'inclusion est faite dans l'Epon. Cette résine a pour composition :

Epon	Epikote 812	.....	81 ml (résine)
	DDSA*	.....	50 ml (durcisseur)
	MNA**	.....	44,5 ml (durcisseur).

\* DDSA : anhydride dodécényl succinique

\*\* MNA : anhydride méthyl nadique.

Ce mélange devient progressivement visqueux, il se conserve un à deux mois en chambre froide (4°). Il doit être réchauffé dans un dessiccateur pour éviter l'entrée d'eau atmosphérique. L'imprégnation débute par deux bains de 20 minutes dans 1 ml de mélange :

Epon ..... 1 volume

Oxyde de propylène 1 volume

puis par deux bains de une heure dans un mélange homogène :

Epon ..... 20 ml

DMP 30\* ..... 0,3 ml (accélérateur de polymérisation).

\* DMP 30 : 2, 4, 6 - diméthyl amino éthyl phénol.

Les échantillons sont placés ensuite au fond de capsules en gélatine. Celles-ci sont alors remplies de résine (Epon + DMP 30).

La polymérisation est réalisée à 60°C pendant 48 heures au moins.

L'examen des coupes minces est fait sur un microscope électronique Siemens Elmiskop I A ou Philips EM 300.

b) Coloration négative.

La coloration négative des membranes par le phosphotungstate de potassium (K-PTA) a été réalisée par la méthode de Parsons (22).

Une solution d'acide phosphotungstique 3 % est ajustée à pH 6,8 de la potasse 10 %, fraîchement préparée. Quelques gouttes de phosphotungstate de potassium additionné de sérum albumine bovine 0,01 % sont déposées sur un morceau de Parafilm. Une aiguille d'acier de 1 mm de diamètre est plongée dans la suspension à examiner (1 à 5 mg de protéine par ml) puis introduite lentement dans la goutte de K-PTA. Un film très fin se forme à la surface de la goutte. Une grille de cuivre pour microscopie électronique, couverte de collodion et de carbone est déposée sur la goutte (côté plastique vers le bas) et retirée après quelques secondes. L'excès de K-PTA est absorbé par une pointe de papier filtre. La grille séchée à l'air est prête pour l'examen.

2.2. Dosage des protéines.

La concentration en protéines est déterminée par la méthode du biuret de Gornall et al. (23) en présence de cholate de sodium.

Dans un tube à essai sont ajoutés successivement et avec une agitation vigoureuse après chaque addition :

fraction à tester ..... 0,025 à 0,1 ml (contenant de 1 à 2 mg  
de protéine).

cholate de sodium ..... 0,2 ml

4 % (p/v)

NaOH 10 % (p/v) ..... pour 2,7 ml suivant la fraction à tester  
 CuSO<sub>4</sub> 1 % (p/v) ..... 0,3 ml

La coloration est développée pendant 15 minutes. La densité optique est mesurée à 540 nm par rapport à un témoin sans protéine.

Dans ces conditions, 1 mg de protéine contenu dans la fraction à tester correspond à une densité optique à 540 nm de 0,085.

### 2.3. Dosage des cytochromes P-540 et P-420.

Les cytochromes P-450 et P-420 sont dosés spectrophotométriquement sous forme du complexe avec l'oxyde de carbone, d'après la technique de Omura et Sato (4)-(24).

L'échantillon mitochondrial (environ 3 mg de protéines) est dilué par 6 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,2. Un demi volume est placé dans une cuvette de spectrophotomètre réduit par quelques grains (2 - 5 mg) de dithionite de sodium (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). L'autre portion est d'abord saturée en oxyde de carbone par un barbotage de une minute environ puis quelques grains de dithionite sont ajoutés. Le spectre est enregistré entre 500 nm et 400 nm sur un spectrophotomètre CARY 15.

Les concentrations en cytochrome P-450 et P-420 sont calculées grâce aux coefficients d'absorption donnés dans le tableau suivant :

Cyt	:	$\epsilon(\text{Cyt r��d.} + \text{Co}) - (\text{Cyt ox.})$	
<hr/>			
P-450	:	$+ 91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$	$\epsilon 450-490 \text{ nm}$
P-450	:	$- 41 \text{ cm} \text{ mM}$	$\epsilon 420-490 \text{ nm}$
P-420	:	$+111 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$	$\epsilon 420-490 \text{ nm}$



Dans un échantillon où les cytochromes P-450 et P-420 sont présents simultanément, le premier coefficient ( $+ 91 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) sert à calculer la concentration du cytochrome P-450; le coefficient négatif ( $-41 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) permet de déduire la contribution du cytochrome P-450 à l'absorption à 420 nm. Le dernier coefficient ( $+ 111 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ) donne alors la concentration du cytochrome P-420.

#### 2.4. Préparation de la métyrapone et du métyrapol tritiés.

##### a) Obtention de métyrapone tritiée.

La métyrapone a été tritiée par échange catalytique en solution aqueuse (CEA, Saclay). 450 mg ont été utilisés et le produit qui nous a été retourné contenait 31 mCi de tritium non-labile. La métyrapone a été purifiée par deux chromatographies préparatives sur couche mince de gel de silice HF 254 (Merck) dans le système chloroforme-méthanol (100 : 8). La tache de métyrapone visible sous lumière ultra-violette est grattée et éluée par l'acétone. La concentration est mesurée par spectrophotométrie : le coefficient d'absorption molaire à 265 nm dans l'éthanol est 5 900. L'activité spécifique incorporée est de 7 dpm/pmole. La localisation des atomes radioactifs et les possibilités de ré-échange du tritium lors de l'utilisation ne sont pas connues.

##### b) Préparation du métyrapol tritié.

Le métyrapol ( $^3\text{H} - 1$ ) a été préparé par réduction de la cétone en position 1 de la métyrapone par le borohydrure de sodium tritié. 1,2 mg de métyrapone en solution dans 0,6 ml de méthanol sont ajoutés à 5 mCi de borohydrure de sodium tritié (7,5 Ci/m mole). Après une heure à température ambiante, 0,2 ml d'acétone sont ajoutés. Le métyrapol est alors purifié par deux chromatographies sur couche mince de gel de silice HF 254 (Merck) dans le système chloroforme - méthanol (100 : 16).

La tache de métyrapol visible sous lumière ultra-violette est grattée et éluée par l'acétone. La molarité des solutions de métyrapol est mesurée par l'absorption à 261 nm dans l'éthanol (coefficient d'absorption molaire : 6 100). L'activité spécifique obtenue est de 2 200 dpm/pmole.

## 2.5. Mesures de radioactivité par scintillation liquide.

Deux types de mélanges sont utilisés pour les mesures :

- le scintillateur au dioxanne est miscible à l'eau, sa composition est la suivante :

Naphtalène .....	200 g
PPO*	12 g
Diméthyl-POPOP** .....	0,6 g
Ethanol .....	100 ml
Dioxanne .....	pour 2 litres.

- le scintillateur au toluène est non miscible à l'eau. Ce scintillateur n'a été utilisé que pour le cas particulier du dosage de la monoamine oxydase. Sa composition est la suivante :

PPO*	8 g
Diméthyl-POPOP** .....	0,2 g
Toluène .....	pour 2 litres.

\* PPO : 2,5 diphényloxazole

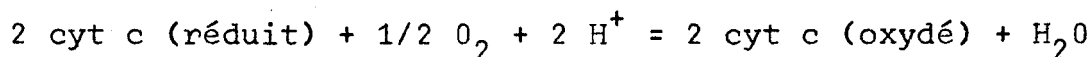
\*\* Diméthyl-POPOP : p-phénylène-2,2' bis (méthyl 4 phényl 5-oxazole).

Les volumes de scintillateurs utilisés sont :

- 20 ml : compteurs "Nuclear-Chicago"
- 10 ml : compteurs "Intertechnique SL 30".

### 3. TESTS ENZYMATIQUES.

#### 3.1. Dosage de la cytochrome c oxydase.



L'oxydation du cytochrome c réduit est suivie à 550 nm au spectrophotomètre. Le coefficient d'absorption (réduit par rapport à oxydé) à 550 nm est  $18,5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . (64).

L'activité enzymatique est latente, l'activation est faite par dilution des suspensions membranaires dans un milieu EDTA 1 mM, bicarbonate de sodium 1 mM et Triton X-100 0,01 %. La dilution est faite 30 minutes avant le test à 0°. La quantité de protéine est choisie pour donner une variation de densité optique comprise entre 0,050 et 0,150 pendant la première minute. Ces quantités de protéine sont très faibles : de 0,002 à 0,010 mg de mitochondries ou de membrane interne de 0,050 à 0,100 mg de membrane externe.

Une solution  $40 \times 10^{-6} \text{ M}$  de cytochrome c dans le tampon phosphate de sodium 0,075 M pH 7,2 (25) est réduite par une pointe de spatule de dithionite de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). En général, la quantité ajoutée est excédentaire d'abord pour réduire le cytochrome c ( $\text{DO}_{550} : \text{DO}_{565} > 6$ ) et d'autre part pour détruire l'oxygène du milieu. Systématiquement, la solution de cytochrome c réduit est réoxygénée et tout excès de dithionite détruit par un court barbotage d'air (1 à 2 minutes). La réoxydation spontanée du cytochrome c réduit est très lente.

La cuve test contient 2 ml de solution de cytochrome c, la réaction est initiée par l'enzyme. La cuve témoin contient 2 ml de solution de cytochrome c complètement oxydé par quelques grains de ferricyanure de potassium ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ). La température de la réaction est 25°.

La cinétique est du premier ordre, la vitesse initiale est déterminée de deux manières :

- soit à partir de la constante de vitesse K et de la concentration initiale en cytochrome c.

$$K = 2,3 \times \frac{\log DO_{t_1} - \log DO_{t_2}}{t_1 - t_2}$$

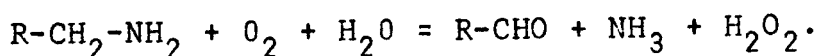
La vitesse initiale est alors :

$$\left( \frac{d(\text{cyt c})}{dt} \right)_{t=0} = K (\text{cyt c})_{t=0}$$

- soit directement à partir de l'enregistrement de la densité optique à 550 nm, sur une échelle amplifiée. La courbe initiale peut être confondue avec la tangente à l'origine avec une bonne précision (26).

L'activité enzymatique est stable au moins deux jours sous réserve de ne pas congeler les fractions dans du tampon phosphate (72). Le pic du cytochrome c réduit étant très aigu il faut vérifier que le spectrophotomètre est bien réglé au maximum d'absorption.

### 3.2. Dosage de la monoamine oxydase.

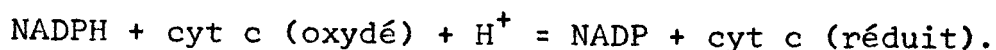


Le test radioactif est réalisé avec la tryptamine comme substrat (27)-(28). Dans un tube à centrifuger conique de 12 ml sont ajoutées 50 nmoles de ( $^{14}C$ ) tryptamine bi-succinate (2 à 10 mCi/mM) sous forme d'une addition de 0,25 ml de mélange tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 - tryptamine 2( $^{14}C$ ) bi-succinate 0,1 mM. Après quelques minutes d'équilibration à 25° dans un bain thermostaté, la réaction est initiée par 0,05 ml de la fraction à tester (0,2 à 0,5 mg de mitochondries).

L'incubation est effectuée à 25° pendant 5 à 10 minutes. Un tube témoin sans enzyme est inclus dans l'incubation.

La réaction est stoppée par 0,2 ml HCl 2N. Les produits formés par désamination sont extraits par 4 ml de scintillateur au toluène en agitant très vigoureusement une vingtaine de secondes. La  $^{14}\text{C}$ -tryptamine reste dans la phase aqueuse acidifiée, la  $^{14}\text{C}$ -indoleacétaldéhyde et, éventuellement, l'acide  $^{14}\text{C}$ -indoleacétique passent dans la phase organique. Pour accélérer la décantation, le mélange est centrifugé 2 minutes dans une centrifugeuse de paillasse. La phase aqueuse est congelée dans un mélange acétone-carboglace et la phase organique est transférée en totalité dans un flacon à scintillation. Le flacon est complété avant comptage par 16 ml de scintillateur au toluène.

### 3.3. Dosage de la NADPH cytochrome c réductase.



La réduction du cytochrome c oxydé est suivie au spectrophotomètre à 550 nm selon la méthode de Sottocasa et al. (29) Le coefficient d'absorption du cytochrome c réduit par rapport au cytochrome c oxydé à 550 nm est  $18,5 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ .

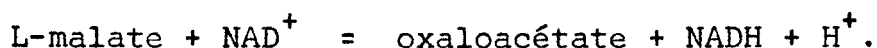
Le milieu de dosage est :

NADPH 0,01 M .....	0,02 ml
Cytochrome c oxydé 0,01 M .....	0,02 ml
Cyanure de potassium 0,1 M .....	0,01 ml
Tampon phosphate de sodium	
50 mM pH 7,5 .....	1,95 ml.

Dans la cuve test, la réaction est initiée par l'enzyme. La cuve témoin contient tous les réactifs excepté l'enzyme, la température de la réaction est 25°.

La quantité de protéine est choisie de façon à ce que l'augmentation de densité optique à 550 nm soit inférieure à 0,1/minute. Les solutions de NADPH sont préparées dans du tampon Tris-HCl 0.1 M pH 8.2 ; elles sont conservées à 4°C. Le cyanure de potassium est dissout dans l'eau distillée juste avant usage.

#### 3.4. Dosage de la malate deshydrogénase.



L'activité malate deshydrogénase est estimée spectrophotométriquement dans le sens oxaloacétate-malate en mesurant la vitesse initiale d'oxydation du NADH.

Dans les fractions mitochondriales l'activité enzymatique est latente. L'activation est réalisée par une dilution 1 : 10 au moins, à 0°, 30 minutes avant la mesure dans un milieu Tris-HCl 1 mM pH 7,5 Triton X-100 0,01 %.

La quantité de protéine est ajustée pour donner une variation de densité optique de 0,05 à 0,1 par minute : 0,002 - 0,010 mg de mitochondries.

Le coefficient d'absorption du NADH à 340 nm est  $6,22 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . L'oxydation du NADH par l'oxaloacétate est mesurée à 340 nm par la méthode de Ochoa (30).

Le milieu de dosage est :

NADH 0,01 M ..... 0,030 ml

Tampon phosphate de sodium

0,1 M pH 7,4 ..... 1,950 ml

Enzyme activé ..... 0,005 à 0,020 ml.

La densité optique à 340 nm est suivie pendant quelques minutes ; si l'oxydation du NADH est appréciable, un inhibiteur respiratoire est ajouté :

Roténone dans l'éthanol ..... 0,005 ml  
10<sup>-3</sup> M

Dans la cuve test, la réaction est initiée par :

Oxaloacétate 0,05 M ..... 0,020 ml.

La cuve témoin contient tous les réactifs sauf le NADH. La solution de NADH est préparée dans un tampon Tris-HCl 0,1 M pH 8,2 ; elle est conservée à 4° et jamais plus de deux semaines. La solution d'oxaloacétate est préparée fraîchement dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M pH 7,4 à 0° et n'est pas conservée.

### 3.5. Dosage de l'Adényl cyclase.

ATP → 3', 5' AMP + Pyrophosphate.

L'activité est mesurée par la formation de (<sup>32</sup>P) 3', 5' AMP à partir de (<sup>32</sup>P) ATP. Un système régénérateur d'ATP utilisant le couple phosphoenolpyruvate-pyruvate kinase, permet de maintenir la concentration en ATP constante lors de l'incubation. Une méthyl-xanthine, ici la caféine, inhibe l'activité phosphodiésterasique qui transformerait le 3', 5' AMP en 5' AMP. Le fluorure est utilisé comme activateur non-spécifique de l'adényl cyclase (31).

On prépare un milieu commun, contenant :

eau bidistillée ..... 0,50 ml  
Tris-HCl 0,4 M pH 8,2 ..... 0,10 ml

MgCl<sub>2</sub> 0,6 M ..... 0,02 ml  
 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-ATP 0,1 M (au moins 1 mCi/ml) ..... 0,04 ml  
 Phosphoenolpyruvate de potassium ..... 0,08 ml  
 0,5 M pH 8,2.  
 Pyruvate kinase (enzyme purifiée  
 Boehringer) ..... 0,04 ml

Après 5 minutes d'incubation à 25°, on ajoute :

Caffeine 0,1 M pH 8,2 ..... 0,20 ml  
 NaF 1 M ..... 0,02 ml.

Le pH final est contrôlé et au besoin, ajusté à pH 8,2 avec KOH 0,1 N. Le milieu, préparé juste avant le test, est conservé à 25°.

Dans un tube à centrifuger conique, la fraction à tester (0,1 ml contenant de 1 à 3 mg de protéine) est équilibrée pendant quelques minutes à 25°, la réaction est initiée par 0,1 ml du milieu précédent. Après 10 et 20 minutes d'incubation, la réaction est stoppée par 0,05 ml d'acide trichloracétique 30 %. Les tubes sont transférés dans un bac à glace pendant au moins une demi-heure pour permettre une bonne précipitation des protéines. Après centrifugation, un aliquot de l'extract trichloracétique (0,05 ml) est déposé avec un entraîneur de 3',5'-AMP (0,01 ml, 2 mg/ml) et 0,01 ml d'EDTA 0,4 M, sur une feuille de papier Whatman n° 1 imprégnée de sulfate d'ammonium (32). La technique d'imprégnation est la suivante :

Les feuilles sont immergées pendant une dizaine de minutes dans une solution de sulfate d'ammonium 60 g/litre-EDTA 2mM. Les feuilles, séchées à la température ambiante dans une hotte ventilée, sont prêtes à être utilisées. La séparation entre le 3', 5'-AMP et le 5'-AMP, l'ATP, l'ADP le pyrophosphate et le phosphate est réalisée par 16 heures de migration en chromatographie descendante à la température ambiante avec la phase décrite par Krebs et Hems (33) modifiée comme suit :



acide isobutyrique, ammoniacque, 1 N, EDTA 0,4 N dans les proportions volumétriques 400 : 120 : 1. (34).

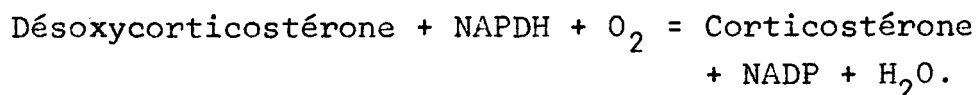
Les spots sont repérés sous éclairage ultra-violet. Dans les conditions décrites ci-dessus, le 3', 5'-AMP ( $R_f = 0.46$ ) migre nettement en avant de l'AMP ( $R_f = 0.30$ ), de l'ADP ( $R_f = 0.13$ ) de l'ATP, du pyrophosphate et du phosphate ( $R_f = 0.04$ ). Le spot nonradioactif, visible en avant de l'AMP cyclique ( $R_f = 0.7$ ) est la caféine.

Le spot de 3', 5'-AMP est découpé et la radioactivité mesurée dans un compteur à bas mouvement propre (modèle RA 15, Intertechnique).

Des témoins sont conduits dans lesquels l'acide trichloracétique est ajouté avant le milieu réactionnel.

L'activité enzymatique est exprimée en picomoles de 3',5'-AMP formé/ minute / mg de protéine.

### 3.6. Dosage du système de 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes.



L'activité est mesurée par la formation de  $^{14}\text{C}$ -corticostérone à partir de  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone en présence de systèmes générateurs de NADPH.

Un milieu commun est préparé contenant :

NADP 0,1 M .....0,2 ml  
Glucose-6-phosphate 0,2 M .....1,00 ml

Glucose-6-phosphate deshydrogénase ..... 0,025 ml  
 (enzyme purifiée Boehringer ; G6PDH 15303  
 5 mg/ml)

L-malate 1 M ..... 0,1 ml

$^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone 0,04 M ..... 0,1 ml  
 (en solution dans le propylène glycol  
 ou la diméthyl formamide).

Tampon Tris-HCl 0,05 M pH 7,4 ..... 7,58 ml

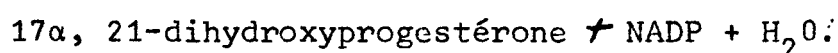
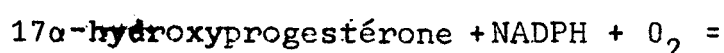
Le milieu est préincubé 5 minutes à 25°.

Dans un tube, la fraction à tester (0,1 ml contenant 0,5 à 3 mg de protéine) est équilibrée quelques minutes à 25°. La réaction est initiée par 0,9 ml du milieu précédent. L'incubation est faite à 25°, dans un bain thermostaté pendant 10 à 20 minutes en agitant souvent. La réaction est stoppée par 5 ml de chlorure de méthylène ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  = dichlorométhane). Dans un tube témoin, le milieu est ajouté après le chlorure de méthylène.

Les stéroïdes sont extraits par une agitation vigoureuse. La phase aqueuse est éliminée et l'extrait évaporé sous un courant d'azote. Le résidu est repris par un petit volume de chlorure de méthylène et la totalité est déposée sur une plaque de gel de silice ayant un indicateur fluorescent (HF 254 Merck). Le solvant utilisé pour le développement est un mélange chloroforme-méthanol 95 : 5 (v/v). La migration dure environ 45 minutes à la température ambiante. Les stéroïdes sont repérés sous une lampe ultra violette : ce sont des taches sombres sur un fond fluorescent. (le chlorure de méthylène commercial (Prolabo) contient une impureté migrant légèrement en avant des stéroïdes ; une distillation sur une colonne de Vigreux de 30 cm est insuffisante pour se débarrasser de cette impureté). L'aire correspondant à chaque stéroïde est transférée dans un tube et le stéroïde extrait par 2 ml de chlorure de méthylène. L'extrait est placé dans un flacon à scintillation, le chlorure de méthylène est évaporé sous un courant d'air. Le flacon est rempli de 20 ml de scintillateur au dioxanne et compté.

Le pourcentage de corticostérone formée permet de déduire la quantité absolue produite pendant l'incubation connaissant la quantité totale de désoxycorticostérone utilisée comme substrat.

### 3.7. Dosage du système de 21-hydroxylation des stéroïdes.



L'activité est estimée par l'apparition de 17 $\alpha$ , 21-dihydroxy-20 céto-stéroïdes qui sont mesurés colorimétriquement par la technique de Porter et Silber (35).

Un milieu commun est préparé contenant :

NADP 0,1 M .....	0,20 ml
Glucose-6-phosphate 0,2 M .....	1,00 ml
Glucose-6-phosphate deshydrogénase ...	0,05 ml
(enzyme purifiée ; Boehringer 5 mg/ml)	
Tris-HCl 0,05 M .....	8,75 ml

Le milieu est pré-incubé 5 minutes à 37°C. Dans chaque tube sont placés la fraction à tester (0,2 ml contenant de 1 à 4 mg de protéine) et 0,01 ml de 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone 0,04 M (en solution dans le dimethyl formamide). Après une brève équilibration à 37°C, la réaction est initiée par 0,9 ml du milieu précédent.

L'incubation dure 30 minutes à 37°C, en agitant souvent les tubes. La réaction est stoppée par 5 ml de chloroforme et les stéroïdes sont extraits par 15 à 20 secondes d'agitation vigoureuse.

Après centrifugation, la phase aqueuse supérieure et le précipité protéique sont éliminés. La phase organique est lavée par une brève agitation avec 0,5 ml NaOH 0,1 N ; après centrifugation la phase aqueuse supérieure est éliminée (ce temps de lavage par la soude est réduit au minimum). A 2,5 ml de l'extrait chloroformique sont ajoutés 3 ml de réactif de Porter et Silber préparé extemporanément :

Chlorhydrate de phénylhydrazine .....	65 mg
H <sub>2</sub> O .....	38 ml
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	62 ml
Ethanol absolu .....	50 ml

Après 3 minutes d'une agitation vigoureuse, les tubes sont centrifugés 5 minutes et la phase supérieure transférée dans d'autres tubes. La coloration jaune est développée 30 minutes à 37°C. La densité optique est mesurée au spectrophotomètre à 410 nm par rapport à des tubes zéros (tubes dans lesquels le milieu d'incubation est ajouté après le chloroforme). Les fractions subcellulaires apportent peu de chromogènes parasites : les tubes zéros lus à 410 nm, par rapport au réactif de Porter et Silber, ont, en général, une densité optique inférieure à 0,020. Une gamme d'étalonnage est réalisée dans les mêmes conditions que ci-dessus avec 20, 40, 60 et 80 microgrammes de 17 $\alpha$ , 21-dihydroxyprogestérone (composé S).

#### 4. TECHNIQUE DE MESURE DE LA FIXATION DES STEROIDES SUR LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

##### 4.1. Préincubation des mitochondries de cortex surrénal.

Pour assurer l'épuisement des substrats endogènes, (anions du cycle tricarboxylique en particulier), qui pourraient fournir

du NADPH et entraîner la transformation de la désoxycorticostérone ajoutée en corticostérone, les mitochondries sont prétraitées. Dans une première méthode, les mitochondries sont diluées dans un grand volume de tampon phosphate de sodium (1 mM, pH 7,3) à 25°C pendant 10 minutes. Ce procédé utilisant un tampon très hypotonique a l'inconvénient de faire gonfler les mitochondries et cela entraîne une perte incontrôlée d'une partie des protéines de la matrice. Dans une deuxième méthode, les mitochondries subissent deux préincubations successives de 5 minutes à 25°C dans un milieu salin isotonique : 0,10 M KCl ; 0,01 M phosphate de sodium, 0,01 M HEPES (acide N-2-hydroxyéthylpiperazine -N-2-éthane sulfonique) ; pH final 7,3.

Le volume du milieu de préincubation est tel que la concentration en protéine soit 1-2 mg/ml. A la fin du traitement, les mitochondries sont centrifugées à 15 000 g pendant 10 minutes et les culots sont remis en suspension à 0°C dans du saccharose isotonique : 0,25 M saccharose ; 2 mM Tris - HCl ; pH 7,3. La concentration en protéines est alors 40 - 50 mg/ml.

#### 4.2. Mesure de la fixation des stéroïdes sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Dans des conditions standard, les mesures de fixation sont faites dans un milieu salin isotonique : 0,10 M KCl ; 0,01 M phosphate de potassium ; 0,01 M HEPES (acide N-2-hydroxyéthyl piperazine -N-2-éthane sulfonique) ; 0,1 - 30  $\mu$ M  $^{14}$ C-désoxycorticostérone, pH final 7,3. La fixation est initiée par l'addition des mitochondries prétraitées. Le volume final est, en général, 2 ml. Après 3 minutes à 25°C (ou 10 minutes à 0°C), les tubes sont centrifugés à 20 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants (stéroïde libre) sont recueillis dans des flacons de comptage. Les parois des tubes à centrifuger sont rapidement rincées par 10 ml d'eau distillée à 0°C et égouttées sur papier filtre. Les culots (stéroïde lié) après solubilisation par chauffage à 180°C (bain de sable) dans 1 ml de formamide sont transférés dans un flacon de comptage.

Après addition de scintillateur au dioxanne, la radio-activité contenue dans les surnageants et les culots est mesurée par scintillation liquide.

La séparation des mitochondries de leur milieu d'incubation par filtration sur Millipore (qui sera décrite plus loin pour les mesures de fixation du  $^3\text{H}$  - metyrapol) n'est pas utilisable avec les stéroïdes en raison de leur forte rétention non-spécifique. Par exemple, en l'absence de mitochondries, si 100 nmoles de  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone sont filtrées sur Millipore HAWP (taille des pores : 0,45  $\mu$ , diamètre : 25 mm), 20 nmoles (20 %) sont retenues sur le filtre après lavage par 8 ml de milieu salin. A ce titre, les résultats préliminaires de Purvis et al (36) concernant la fixation de désoxycorticostérone sur les mitochondries de cortex surrénal doivent être considérés avec prudence.

#### 4.3. Décomposition des courbes de fixation des stéroïdes sur les mitochondries de cortex surrénal en deux classes de sites indépendants (dont une classe de sites non-spécifiques de faible affinité).

La loi d'action de masse appliquée à l'équilibre de fixation est :

$$B = B_S + B_{NS} = \frac{N_1 F}{K_1 + F} + \frac{N_2}{K_2} F \quad (\text{Eq. 1}).$$

$\left( \frac{\quad}{\quad} \right)$   
 $B_S$

$\left( \frac{\quad}{\quad} \right)$   
 $B_{NS}$

Dans le terme  $B_{NS}$ , F a été négligé devant  $K_2$ .

- $N_1$ ,  $K_1$  sont le nombre de sites et la constante de dissociation des sites de forte affinité.

- F est la concentration du ligand libre,
- B, B<sub>S</sub>, B<sub>NS</sub> sont respectivement le ligand lié total (B), spécifique (B<sub>S</sub>) et non spécifique (B<sub>NS</sub>).

Une valeur de départ ( $N_2/K_2$ ) est choisie, telle que ( $N_2/K_2$ ) soit tangente à la courbe de fixation pour les concentrations en ligand élevées.

A partir des couples de valeurs expérimentales (B, B/F), sont calculés :

$$B_{NS} = \frac{N_2}{K_2} F \quad (\text{Eq. 2}).$$

$$B_S = B - B_{NS} \quad (\text{Eq. 3}).$$

Et, enfin, B<sub>S</sub>/F.

Une régression linéaire est effectuée sur les couples de points (B<sub>S</sub>, B<sub>S</sub>/F). En faisant varier ( $N_2/K_2$ ) le coefficient de régression croît, passe par un maximum puis décroît à nouveau. La droite choisie est celle qui a le meilleur coefficient de régression (le plus proche de l'unité). Cette "meilleure" droite a pour intersections : N<sub>1</sub> avec l'axe des ordonnées et ( $N_1/K_1$ ) avec l'axe des abscisses.

Des méthodes graphiques utilisant le même principe ont été utilisées par divers auteurs : Scatchard et al. (37), Rosenthal (38), Danchin et Guéron (39). La méthode numérique décrite ci-dessus permet une évaluation plus objective de la meilleure solution.

Un exemple concret est donné ci-après (fig. 4).

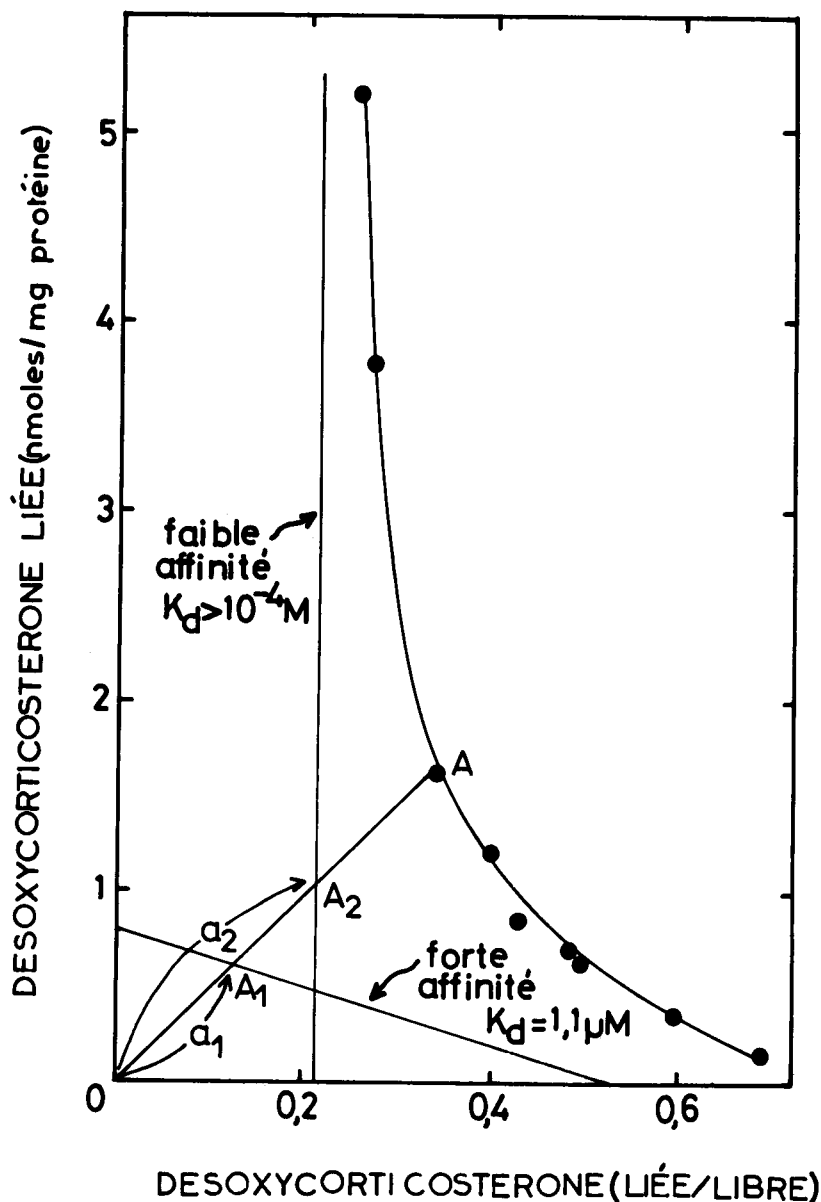


Fig. 4. Fixation de  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

La fixation de  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone a été mesurée à  $25^{\circ}\text{C}$  sur les mitochondries de cortex surrénal (2,4 mg de protéine). La concentration en  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone a varié entre 0,26 et 18  $\mu\text{M}$ .

Les résultats sont tracés selon Scatchard (118).

La courbe passant par les points expérimentaux est la courbe théorique déterminée pour deux classes de sites (faible et forte affinité), représentées par les deux droites ayant les paramètres numériques suivants  $N_2/K_2=0,215$  et  $N_1=0,8$  nmole/mg de protéine et  $K_1=1,06$   $\mu\text{M}$ . Cette courbe est construite point par point soit numériquement, soit par la méthode graphique de Rosenthal (38) : le point A est tel que  $OA = OA_1 + OA_2$ .



Le tableau suivant rassemble : les valeurs de ( $N_2/K_2$ ) essayées, les coefficients de régression linéaire ( $r$ ) et les valeurs correspondantes de  $N_1$  et  $K_1$ .

Essai	$N_2/K_2$	$r$	$N_1$ (nmoles/mg)	$K_1$ ( $\mu M$ )
1	0,24	- 0,6176	0,433	0,38
2	0,225	- 0,9685	0,647	0,79
3	0,22	- 0,9877	0,722	0,92
4	0,215	- 0,9898	0,800	1,06
5	0,210	- 0,9840	0,879	1,20

La meilleure solution, dans l'hypothèse posée au départ (Eq. 1) où la seconde classe de sites est très non-spécifique, est obtenue lors du quatrième essai pour  $N_2/K_2 = 0,215$  ;  $N_1 = 0,8$  nanomole/mg de protéine et  $K_1 = 1,06 \mu M$ . La figure 4 montre les résultats expérimentaux et les deux droites calculées correspondant aux sites de forte et faible affinité. La courbe tracée est la courbe théorique obtenue avec les meilleurs paramètres ci-dessus selon l'équation 1, l'accord avec les points expérimentaux est très convenable.

Soulignons que des solutions aussi bonnes peuvent être obtenues en utilisant une équation de fixation non-simplifiée :

$$B = \frac{N_1 F}{K_1 + F} + \frac{N_2 F}{K_2 + F}$$

par exemple, en choisissant  $N_2 = 120$  nmoles/mg et  $K_2 = 0,37$  mM, le calcul donne  $N_1 = 0,74$  nmole/mg et  $K_1 = 1,0 \mu M$  avec un coefficient de régression linéaire  $r = -0,9902$ .

Dans ce cas, un calcul logique de la meilleure solution est complexe (40)-(41) et, en général, la méthode simplifiée a une précision très suffisante.

#### 4.4. Technique de mesure de la fixation du métyrapol et de la métyrapone.

Dans des conditions standard, les mesures de fixation sont faites dans un milieu salin isotonique : 0,1 M KCl ; 0,01 M phosphate de potassium ; 0,01 M HEPES (acide N-2-hydroxyéthylpipérazine -N-2-éthane sulfonique) ; 0,01 - 5  $\mu$ M  $^3$ H-métyrapol ; pH final : 7,2. La fixation est initiée par l'addition des mitochondries. Le volume final est 2,0 ml. Après 10 minutes à 0°C, l'incubation est stoppée en séparant les mitochondries du milieu d'incubation. Deux procédés ont été utilisés : la centrifugation et la filtration sur Millipore.

##### a) Technique par centrifugation :

La technique est analogue à celle décrite pour les stéroïdes (voir paragraphe précédent). Les mitochondries sont sédimentées par centrifugation à 20 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant (métyrapol libre) est directement recueilli dans un flacon de comptage ; les parois du tube sont rapidement rincées par 10 ml d'eau distillée à 0°C et égouttées sur papier filtre. Le culot après digestion par chauffage à 180°C (bain de sable) dans 1 ml de formamide (métyrapol lié) est transféré dans un flacon de comptage.

Après addition de scintillateur à base de dioxanne, la radio-activité du culot et du surnageant est mesurée par scintillation liquide.

Des quantités de protéines comprises entre 0,5 et 10 mg ont été utilisées.

b) Technique par filtration sur Millipore :

Les filtres Millipore HAWP (taille des pores :  $0,45 \mu$  ; diamètre du filtre : 25 mm) retiennent les mitochondries et permettent ainsi leur séparation du milieu d'incubation. Les filtres se colmatent rapidement quand la quantité de protéine est élevée. Pratiquement, nous n'avons pas utilisé plus de 1 mg de protéines mitochondriales, pour que les temps de filtration restent suffisamment brefs. De plus, les caractéristiques de filtration sont très perturbées par divers traitements de mitochondries (par exemple : dénaturation thermique). Dans ces cas, seule la méthode précédente, par centrifugation est employée.

Notons également que la rétention non-spécifique du  $^3\text{H}$ -métyrapol ou de la  $^3\text{H}$ -métyrapone sur les filtres Millipore est faible.

Exemple :

En l'absence de mitochondries, lorsque 33 nanomoles de  $^3\text{H}$ -métyrapol sont filtrées sur Millipore, 1 nanomole seulement (3 %) est retenue après lavage du filtre par 10 ml de milieu salin.

Deux procédés de mesure ont été utilisés avec le comptage soit du filtre ( $^3\text{H}$ -métyrapol lié), soit du filtrat ( $^3\text{H}$ -métyrapol libre).

Dans le premier procédé, le filtre Millipore, déposé humide sur une grille métallique est maintenu en place par une cheminée métallique refroidie à  $0^\circ\text{C}$ . L'ensemble est placé sur une fiole à vide et mis sous l'aspiration d'une trompe à eau. Au temps requis, le contenu du tube d'incubation est rapidement filtré et le filtre est lavé par 5 à 10 ml de milieu salin à  $0^\circ\text{C}$ . Le temps total entre le transfert des mitochondries et la fin du lavage est compris entre 15 et 25 secondes (Il est fonction du volume de lavage et de la quantité de protéines). La méthode décrite n'est donc pas valable pour des études de cinétique de fixation.

Le filtre placé dans une fiole de comptage, est solubilisé par 1 ml de monométhyléther de l'éthylène glycol ("methyl-cellosolve"). Après addition de scintillateur au dioxanne, la radio-activité du filtre ( $^3\text{H}$ -métyrapol lié) est mesurée par scintillation liquide.

Dans le second procédé, les filtres Millipores sont disposés dans un adaptateur de type Swinney fixé à un corps de seringue hypodermique de 5 ml. Au temps requis le contenu du tube d'incubation est transféré dans la seringue, le piston est introduit et rapidement poussé. L'incubation est réalisée à  $0^\circ$  et le reste des opérations en chambre froide ( $0-4^\circ\text{C}$ ). La radio-activité d'une fraction du filtrat ( $^3\text{H}$ -métyrapol libre) est mesurée par scintillation liquide. Cette méthode permet des mesures de fixation sur des temps courts (5-7 secondes).

## CHAPITRE II

### PROPRIETES GENERALES DES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

#### 1. FRACTIONNEMENT SUBCELLULAIRE DU CORTEX SURRENAL DE BOEUF. PURIFICATION DES MITOCHONDRIES.

La table 1 regroupe les valeurs de diverses activités enzymatiques associées aux fractions subcellulaires brutes obtenues par centrifugation différentielle.

Les activités choisies sont des enzymes marqueurs typiques : cytochrome c oxydase et monoamine oxydase pour les mitochondries, 21-hydroxylase pour les microsomes et 5'-nucléotidase et adényl cyclase pour les membranes plasmiques. La glucose -6-phosphatase qui est une enzyme marqueur caractéristique des microsomes de foie de rat (42) a une activité trop faible dans le cortex surrénal pour être utilisable (43) et la contribution des phosphatases non-spécifiques dans l'hydrolyse du glucose -6-phosphate ne peut pas être estimée avec précision. La NADPH cytochrome c réductase, également une enzyme marqueur des microsomes dans le foie (44) est présente dans les mitochondries et dans les microsomes de cortex surrénal (voir ci-après).

L'effet des lavages sur l'augmentation de la pureté des mitochondries est montré dans le tableau 2. Les activités spécifiques de la cytochrome c oxydase et de la monoamine oxydase augmentent alors que les activités spécifiques de la 5'nucléotidase de l'adényl cyclase et de la 21-hydroxylase diminuent. La distribution de la NADPH cytochrome c réductase est inattendue : en fait, l'activité spécifique de la NADPH cytochrome c réductase dans les mitochondries purifiées (51 nanomoles cytochrome c réduit/min/mg protéine) est 4 fois plus élevée que celle trouvée dans les microsomes (18 nanomoles cytochrome c réduit/min/mg protéine).

TABLEAU 1

Distribution de diverses activités enzymatiques  
dans les fractions subcellulaires  
du cortex surrénal de boeuf.

Fractions subcellulaires	Protéine mg %	Cyt. c oxydase Act. spé. %	Tryptamine oxydase Act. spé. %	21-hydro- xylase Act. spé. %	5' Nucléo- tidase Act. spé. %	Adényl cyclase Act. spé. %
Homogénat total	7050 (100)	730 (100)	0,058 (100)	0,48 (100)	5,9 (100)	16,4 (100)
Noyaux	1680 (24)	430 (14)	0,035 (14)	0,24 (12)	2,2 (9)	11,8 (17)
Mitochondries	2080 (30)	1300 (53)	0,116 (59)	0,51 (32)	5,0 (25)	23,2 (42)
Microsomes	760 (11)	460 (7)	0,110 (20)	1,57 (36)	12,6 (23)	37,8 (25)
Cytosol	1750 (25)	30 (1)	0,006 (3)	0,24 (13)	8,6 (36)	Non détectée.
(% récupéré)	(90)	(75)	(96)	(93)	(93)	(84)
Microsomes purifiés		220	0,095	-	13,5	53,6

Les diverses fractions subcellulaires ont été obtenues à partir d'un homogénat de cortex surrénal de boeuf (voir Méthodes). Le pourcentage de récupération des activités totales est donné entre parenthèses. Les activités spécifiques (Act. spé.) sont données comme suit : cytochrome oxydase en nmoles cytochrome c oxydé/min/mg de protéine ; Tryptamine oxydase en nmoles tryptamine oxydée/min/mg de protéine ; 21-hydroxylase en nmoles 17 $\alpha$ -21 dihydroxy - 20-céto stéroïde (désoxycortisol) produit/min/mg de protéine ; 5'-Nucléotidase en nmoles phosphate libéré/min/mg de protéine ; Adényl Cyclase en pmoles 3', 5'-AMP cyclique produit/min/mg de protéine.

TABLEAU 2

Effet des lavages successifs

de la fraction mitochondriale du cortex surrénal de boeuf  
sur l'activité spécifique de diverses enzymes

Fractions mitochondriales	Activités spécifiques					
	Cytochrome c oxydase	Tryptamine oxydase	NADPH cyt. c réductase	21-hydroxylase	5 Nucléotidase	Adényl cyclase
Fraction brute	1 300	0,12	15,2	0,51	5,0	23,2
1 lavage	2 100	0,18	22,8	0,29	4,1	9,2
2 lavages	2 400	0,20	36,0	0,18	2,9	8,1
3 lavages	2 800	0,25	51,0	0,07	2,3	6,8

La technique de lavage est décrite dans les méthodes. Les activités spécifiques des enzymes sont exprimées comme dans la table 1 ; la NADPH cytochrome c réductase est exprimée en nmoles cytochrome c réduit/min/mg de protéine.

L'activité NADPH cytochrome c réductase des mitochondries de cortex surrénal est explicable par la présence des systèmes d'hydroxylation associés au cytochrome P-450 et oxydant le NADPH et pour lesquels le cytochrome c est un accepteur artificiel d'électrons.

Notons au passage que le cytochrome c est rapidement réduit (en l'absence de NADPH) par un homogénat de cortex surrénal ou avec les fractions subcellulaires dérivées. L'inactivation thermique (3 min. à 100°C) ne modifiant pas la vitesse de réduction du cytochrome c, cette réaction est sans doute provoquée par l'acide ascorbique endogène présent en quantités importantes dans les glandes surrénales.

Les mitochondries isolées de cortex surrénal purifiées par 3 lavages contiennent moins de 5 % de contamination microsomale (sur la base de la 21-hydroxylase) ; la contamination par les fragments de membrane plasmique est plus difficile à estimer en l'absence de fraction assez purifiée en membranes plasmiques : elle est très inférieure à 12 % (sur la base de l'adényl cyclase).

## 2. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES DES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

Les études au microscope électronique de Palade (45) et Sjöstrand (46) ont démontré que les mitochondries possédaient un double système membranaire.

La membrane externe, d'aspect lisse est la limite périphérique de la mitochondrie, en contact direct avec le cytoplasme extérieur. Cette membrane est en général, considérée comme une simple enveloppe, librement perméable aux petites molécules de poids moléculaire inférieur à 10.000 (47).



La membrane interne de structure , plus complexe est repliée sur elle-même en crêtes de formes très variables suivant le tissu ou l'organisme considéré (48). La membrane interne est la véritable barrière de perméabilité sélective ; elle délimite la matrice mitochondriale.

Les mitochondries de cortex surrénal ont fait l'objet de nombreux travaux en microscopie électronique (49)-(52). Dans ce cas particulier, la membrane interne forme des tubules et des vésicules. Chez les mammifères, cette organisation est inhabituelle et semble caractéristique des organes producteurs de stéroïdes : ovaire, testicule, placenta et cortex surrénal (53); par contre les crêtes tubulo-vésiculaires sont la règle chez certains protozoaires (48). L'apparence vésiculaire de la membrane interne des mitochondries de cortex surrénal dépend partiellement de l'espèce : par exemple, elle est plus marquée chez le rat que chez le boeuf ; de plus elle est contrôlée fonctionnellement par la corticotrophine (52) : en l'absence d'ACTH, les mitochondries ont des crêtes linéaires. Elles redeviennent vésiculaires sous l'effet de la stimulation hormonale. La structure tubulo-vésiculaire est sans doute très favorable à une grande surface membranaire pour un volume donné (49) et une corrélation véritable avec la fonction des mitochondries dans la stéroïdogénèse, déjà suggérée en 1956 par Belt et Pease (53), est très probable.

Les mitochondries isolées par centrifugation différentielle d'un homogénat de cortex surrénal de boeuf sont montrées sur la figure 5.

Les mitochondries de cortex surrénal de boeuf sont en général peu contaminées par les éléments extramitochondriaux. L'apparence particulière de la membrane externe (voir ci-dessous) complique l'estimation de la contamination par les membranes lisses du réticulum endoplasmique. Les structures du type lysosomes sont rarement observées ; par contre des granules contenant les catécholamines et provenant de la médullaire, le sont plus souvent.

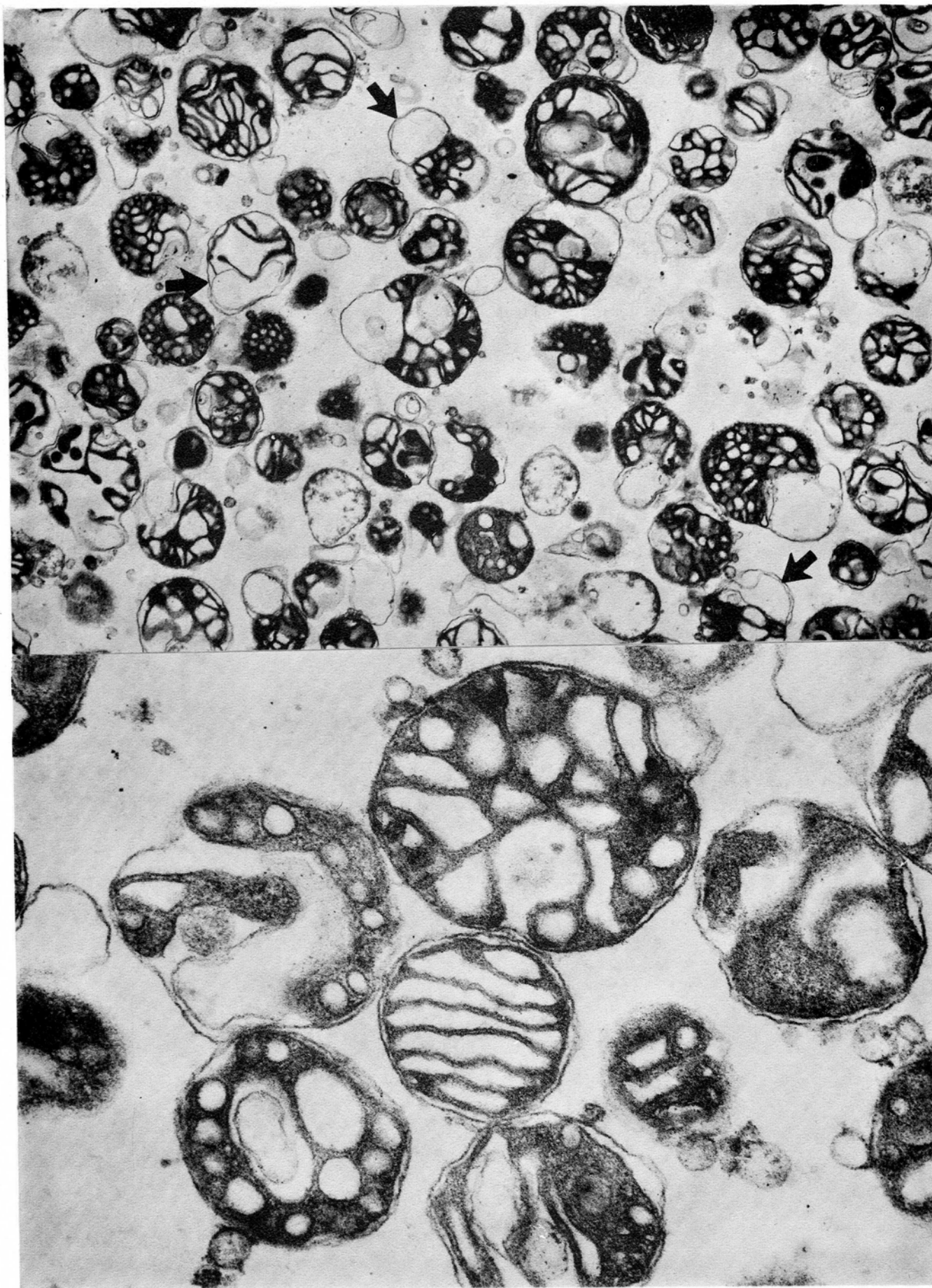


Fig. 5. Coupe mince des mitochondries isolées  
de cortex surrénal de boeuf

Les mitochondries sont intactes et de formes variables. Les membranes externes sont visibles et des structures bordées par deux membranes sont signalées (↑). La membrane interne est très condensée et montre une organisation partiellement vésiculaire. (x 21000 et x 60 000).

L'aspect général des mitochondries de cortex surrénal de boeuf est très polymorphe, par opposition aux mitochondries isolées de foie ou de coeur, par exemple. Elles montrent une membrane externe distincte, bien préservée, présentant très souvent un appendice caractéristique à double paroi membranaire. L'espace intermembranaire est élargi et la matrice est plus condensée et plus opaque que dans les mitochondries observées sur les coupes de tissu intact. Cette apparence, propre à toutes les mitochondries isolées en milieu saccharose isotonique, n'est pas un indice de détérioration ; au contraire, des mitochondries endommagées ne peuvent plus maintenir cette structure condensée.

Nos propres observations (153)-(154) sont en accord avec les clichés présentés par Allman et al. (55), Yago et al. (56) et Harding et al. (57), sur les mitochondries isolées de cortex surrénal de boeuf.

### 3. CARACTERISTIQUES BIOCHIMIQUES DES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

#### 3.1. Utilisation de l'oxygène par les mitochondries de cortex surrénal de boeuf : respiration et hydroxylation.

##### a) Respiration mitochondriale.

La respiration des mitochondries de cortex surrénal a été mesurée par polarographie avec une électrode de Clark (58). La figure 6 montre que les mitochondries isolées par la technique décrite (voir chapitre I, Méthodes), présentent le phénomène de contrôle respiratoire décrit par Chance et Williams (59) pour les mitochondries de foie et de coeur. Les mitochondries de cortex surrénal de boeuf, mises en présence de malate ou de succinate respirent lentement en l'absence d'ADP.

L'addition de ADP(190  $\mu$ M) stimule environ deux fois la vitesse de respiration. La respiration retourne à un état contrôlé lorsque tout l'ADP a été phosphorylé en ATP. De tels cycles de stimulation par l'ADP peuvent être répétés jusqu'à consommation totale de l'oxygène du milieu réactionnel. Les index de contrôle respiratoire (rapport entre les vitesses de respiration stimulée et contrôlée) des mitochondries de cortex surrénal sont peu élevés, dans les meilleures expériences, ils ont pu atteindre une valeur de 3, alors que ceux des mitochondries hépatiques ou cardiaques sont souvent compris entre 5 et 10. Le quotient de phosphorylation (P/O) est mesuré à partir des tracés polarographiques en déterminant la consommation d'oxygène pendant la respiration stimulée pour une quantité limitante d'ADP ajoutée. Les valeurs des (P/O) obtenues pour le malate sont comprises entre 2 et 2,6 (valeur théorique : 3) et pour le succinate 1,5 à 1,8 (valeur théorique : 2). Cammer et Estabrook ont obtenu des résultats similaires (60) en ce qui concerne en particulier, les index de contrôle respiratoire et les quotients de phosphorylation. Ces expériences montrent que les mitochondries de cortex surrénal de boeuf ont une chaîne respiratoire capable de réaliser efficacement les réactions de l'oxydation phosphorylante. Les faibles valeurs des quotients de phosphorylation et des index de contrôle respiratoire sont explicables vraisemblablement par le délai assez long qui sépare la mort de l'animal de l'obtention des mitochondries au laboratoire.

Les actions des inhibiteurs respiratoires (cyanure, antimycine A), des découplants (2,4-dinitrophénol), d'un inhibiteur de la pénétration des adénines-nucléotides(atractylate), etc..., sont tout-à-fait analogues à celles connues sur les mitochondries de foie ou de coeur.

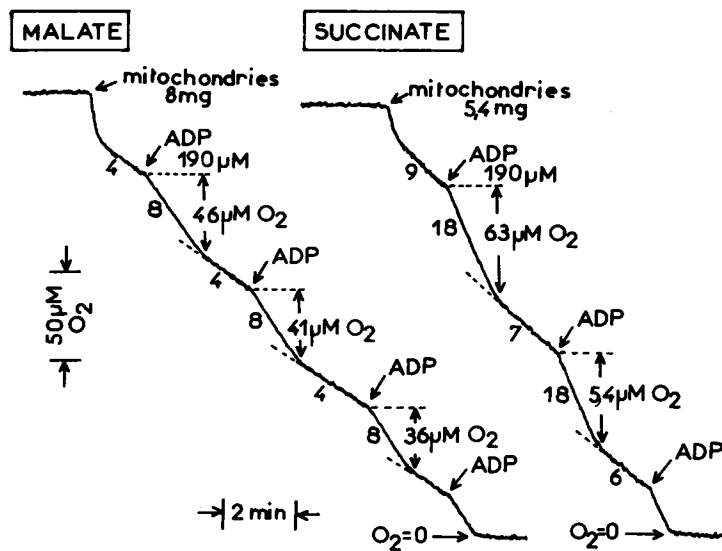


Fig. 6. Effet de l'ADP sur la vitesse de consommation de l'oxygène par les mitochondries de cortex surrénal de bœuf.

Les mitochondries sont introduites dans 2,0 ml de milieu salin isotonique à 25°C, pH 7,2. Les substrats respiratoires sont le L-malate (10 mM) ou le succinate (10 mM). Les additions d'ADP (190 μM) sont effectuées comme indiquées. Les quotients de phosphorylation (P/O) ont les valeurs suivantes :

avec le L-malate, et dans l'ordre de chaque addition : 2,0 - 2,3 et 2,6 ; avec le succinate : 1,5 et 1,8.

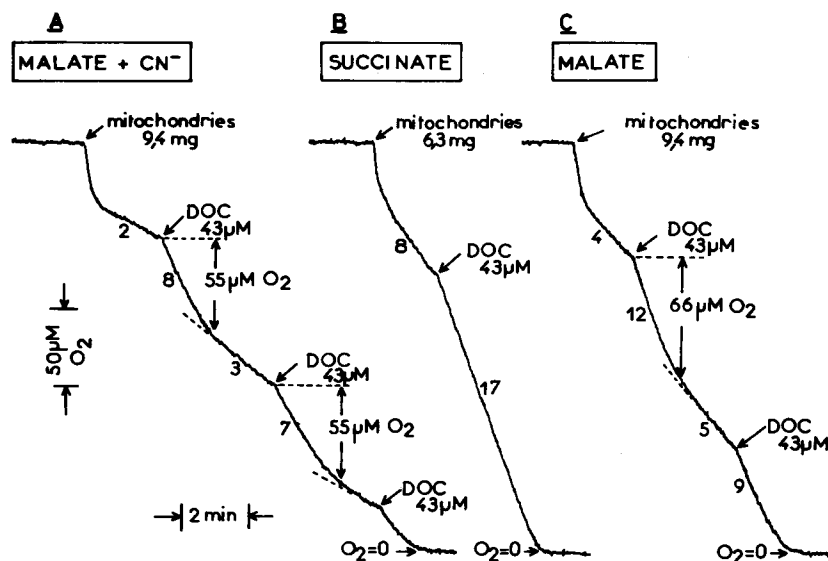


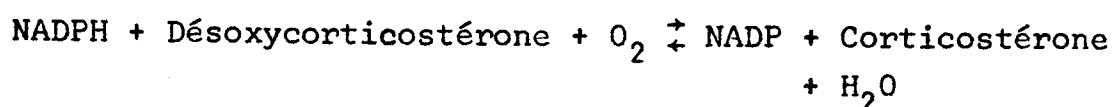
Fig. 7. Effet de la désoxycorticostérone sur la vitesse de consommation d'oxygène par les mitochondries de cortex surrénal de bœuf.

Les mitochondries sont introduites dans 2,0 ml de milieu salin isotonique à 25°C, pH 7,2, contenant, de droite à gauche, du L-malate (10 mM), du succinate (10 mM), ou du L-malate (10 mM) et du cyanure de potassium (1 mM).

Les chiffres le long des tracés sont les consommations d'oxygène en nmoles O<sub>2</sub>/minute/mg de protéine.

b) 11 $\beta$ -hydroxylation.

Les mitochondries de cortex surrénal de boeuf sont capables d'hydroxyler, en position 11 $\beta$ , la désoxycorticostérone en corticostérone quand un substrat du cycle de Krebs est ajouté au milieu d'incubation (11)-(12)-(60). L'oxygène sous sa forme moléculaire est un réactant dans la réaction d'hydroxylation selon l'équation :



La figure 7 montre que lorsque la désoxycorticostérone est ajoutée à des mitochondries respirant sur succinate (B) ou sur malate (C), la vitesse de consommation de l'oxygène augmente. Avec le malate comme substrat, cette dernière ralentit à nouveau quand le stéroïde a été hydroxylé et une vitesse plus rapide de respiration est ré-initiée par une seconde aliquote de désoxycorticostérone. La trace polarographique (A) illustre la stimulation par la désoxycorticostérone de la respiration sur malate insensible au cyanure. Dans ce cas, la chaîne respiratoire est bloquée au niveau de la cytochrome c oxydase par le cyanure et seule la contribution de la chaîne d'hydroxylation associée au cytochrome P-450 est mesurée. L'addition de quantités limitantes de désoxycorticostérone (DOC) permet de calculer un quotient (DOC/O<sub>2</sub>) de 0,85 avec le malate en présence de cyanure (valeur limite : 1). L'écart avec la valeur théorique rend compte de l'oxygène utilisé pour des réactions non couplées à la 11 $\beta$ -hydroxylation de la DOC. En l'absence de cyanure, la "fuite" d'oxygène est élevée ; avec le malate comme substrat, (DOC/O<sub>2</sub>) = 0,65 et avec le succinate (DOC/O<sub>2</sub>) est inférieur à 0,3.

Notons qu'avec le succinate, à la différence du malate, la consommation d'oxygène est complètement bloquée par le cyanure et qu'alors aucune 11 $\beta$ -hydroxylation est possible.

c) Action du ferricyanure de potassium sur la respiration et la 11 $\beta$ -hydroxylation dans les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Le ferricyanure de potassium agit comme un accepteur d'électrons lors de sa réduction en ferrocyanure. Non-pénétrant dans les mitochondries de foie de rat (61), il piège néanmoins les électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale ; ceci constitue une des preuves de la localisation du cytochrome c sur la face externe de la membrane interne. La trace polarographique montrée sur la figure 8 illustre l'effet du ferricyanure sur les mitochondries de cortex.

Après l'introduction des mitochondries dans la chambre de l'électrode à oxygène, une respiration lente utilisant les substrats endogènes est observée. L'addition de malate augmente la consommation d'oxygène, celle de ferricyanure l'inhibe sévèrement en déviant les électrons de la chaîne respiratoire qui ne peuvent plus réagir avec l'oxygène. La désoxycorticostérone stimule la respiration insensible au ferricyanure. Une addition ultérieure de cyanure de potassium pour bloquer la chaîne respiratoire montre que la vitesse d'hydroxylation reste élevée.

Il apparaît donc que le ferricyanure de potassium n'a pas accès au système de 11 $\beta$ -hydroxylation dans les mitochondries intactes, alors qu'il peut fort bien être un accepteur artificiel pour la NADPH adrenodoxine réductase isolée (62).

3.2. Mesure de l'affinité pour l'oxygène de la chaîne respiratoire et de la chaîne d'hydroxylation.

a) Affinité du cytochrome P-450 pour l'oxygène.

En se plaçant dans des conditions où la concentration en oxygène dans le milieu réactionnel est le facteur limitant du transfert d'électrons, l'analyse des courbes de consommation

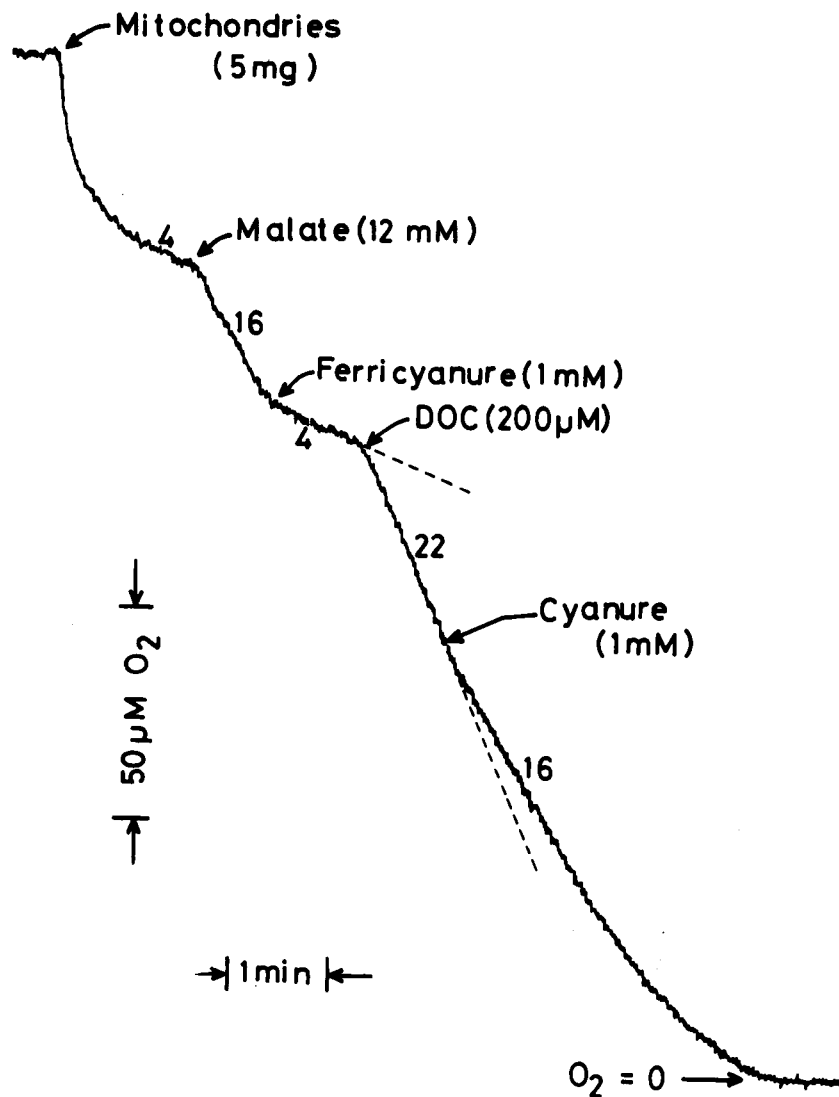


Fig. 8. Effet du ferricyanure de potassium sur la respiration et la  $11\beta$ -hydroxylation des mitochondries de cortex surrénal de boeuf

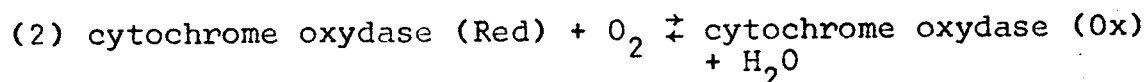
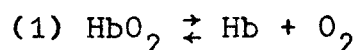
Les mitochondries de cortex surrénal (5 mg de protéine) sont introduites dans 2,0 ml de milieu salin isotonique à  $25^\circ\text{C}$ , pH 7,2. Le L-malate (12 mM), le ferricyanure de potassium (1 mM), la désoxycorticostérone (200  $\mu\text{M}$ ) et le cyanure de potassium (1 mM) sont ajoutés comme indiqué. Les chiffres le long de la trace sont les vitesses de consommation d'oxygène en nmoles  $\text{O}_2$ /minute/mg de protéine.



d'oxygène aux faibles concentrations en oxygène, permet de déterminer une valeur approchée du  $K_m$  pour l'oxygène (63). Les mitochondries de cortex surrénal, en présence d'un substrat capable de supporter l'hydroxylation : le malate, et de cyanure ou d'antimycine A pour bloquer la chaîne respiratoire, sont mises en présence d'une concentration saturante de désoxycorticostérone pour que la vitesse de consommation d'oxygène soit assimilable à la vitesse maximale ( $V_{max}$ ). La tangente à la courbe de pente ( $V_{max}/2$ ) est tracée (Fig. 9). L'ordonnée du point de tangence fournit une bonne approximation de l'affinité pour l'oxygène ( $K_m$ ). La valeur du  $K_m$  pour l'oxygène du cytochrome P-450 associé à la 11 $\beta$ -hydroxylation est proche de 4  $\mu$ M, ce chiffre est voisin de celui publié par Cammer et Estabrook (64) : 7  $\mu$ M.

b) Affinité de la cytochrome oxydase pour l'oxygène.

Dans les conditions classiques où nous l'utilisons, la méthode polarographique directe n'est plus applicable à la mesure de l'affinité pour l'oxygène de la cytochrome oxydase. Il est malgré tout possible d'observer que le  $K_m$  de la cytochrome oxydase pour l'oxygène est inférieur à 1  $\mu$ M : la vitesse de respiration se maintient identique à la vitesse maximale pour des concentrations en oxygène inférieures à 1-2  $\mu$ M (figure 9). Nous avons employé la méthode proposée par Bârzu et Borza (65), qui utilisent l'hémoglobine comme donneur d'oxygène pour les mitochondries de cortex surrénal. Nous obtenons une superposition des deux équilibres ci-dessous :



c'est à dire l'oxygénation de l'hémoglobine, d'une part, et d'autre part la consommation d'oxygène par les mitochondries.

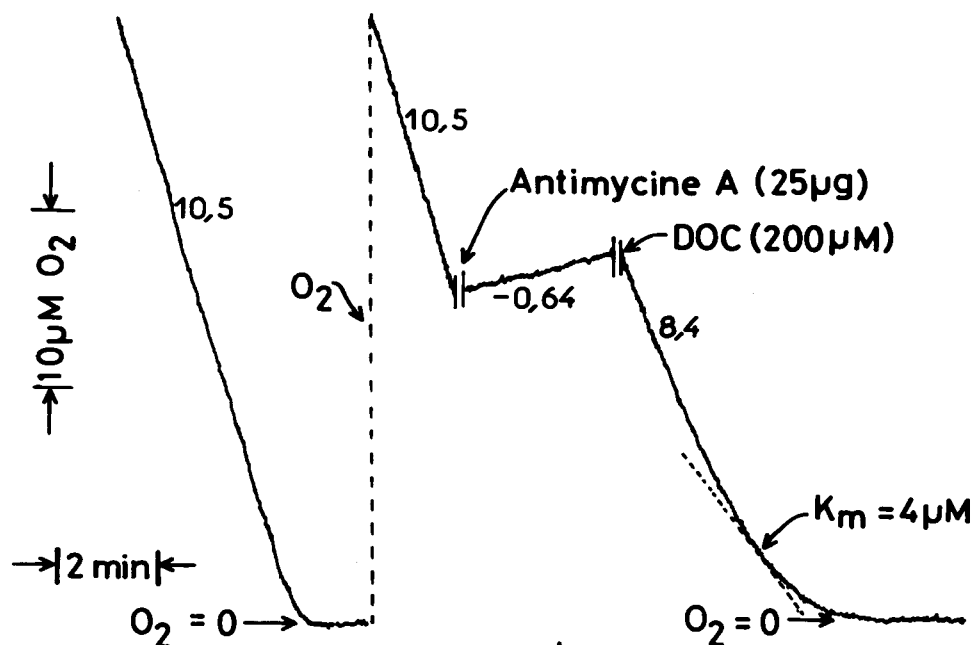


Fig. 9. Mesure de l'affinité pour l'oxygène  
des systèmes respiratoire  
des mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Les mitochondries de cortex surrénal (4,9 mg) sont ajoutées à 2,0 ml de milieu salin isotonique à 25°C et pH 7,2. Le substrat utilisé est le L-malate (10 mM) car il fonctionne à la fois avec la chaîne respiratoire (malate deshydrogénase) et avec la chaîne de 11 $\beta$ -hydroxylation (enzyme malique). La consommation d'oxygène est enregistrée pour les faibles concentrations en oxygène (0-35  $\mu$ M O<sub>2</sub>).

Les chiffres le long des tracés sont les vitesses de consommation d'oxygène en  $\mu$ M O<sub>2</sub>/min. De gauche à droite nous observons d'abord l'utilisation de l'oxygène par la chaîne respiratoire. Elle se maintient à sa vitesse maximale même pour une concentration en oxygène de 1  $\mu$ M. Quand l'anaérobiose (O<sub>2</sub> = 0) est atteinte, le milieu est rapidement réoxygéné, puis un inhibiteur respiratoire : l'Antimycine A (25  $\mu$ g) est ajoutée. En raison du gradient important (la concentration en oxygène dans la cuve est environ 20  $\mu$ M, en équilibre avec l'air, la concentration serait 240  $\mu$ M) une légère entrée d'oxygène est mesurée.

L'addition de désoxycorticostérone (200  $\mu$ M) provoque une utilisation d'oxygène par le cytochrome P-450. Le K<sub>m</sub> pour l'oxygène est déterminé en traçant la tangente ayant une pente égale à la moitié de la pente maximale en présence de stéroïdes.

Bârzu et Borza (65) ont établi l'équation reliant la vitesse de désoxygénation de l'hémoglobine mesurée par spectrophotométrie au  $K_m$  de la cytochrome c oxydase pour l'oxygène. Les expériences sont faites à 540 et 560 nm avec le spectrophotomètre à double longueur d'onde Chance-Aminco. L'hémoglobine sert d'indicateur très sensible de la concentration en oxygène dans le milieu réactionnel. La valeur moyenne de l'affinité pour l'oxygène de la chaîne respiratoire des mitochondries de cortex surrénal de boeuf est  $K_m = 0,27 \mu M$  (66).

La chaîne d'hydroxylation associée au cytochrome P-450 est donc nettement moins réactive vis-à-vis de l'oxygène que la chaîne respiratoire mitochondriale.

### 3.3. Interactions entre la phosphorylation de l'ADP extramitochondrial et l'hydroxylation de la désoxycorticostérone.

La phosphorylation de l'ADP extramitochondrial a été mesurée avec le malate et le succinate comme substrats respiratoires ; la même expérience a ensuite été réalisée en présence de  $170 \mu M$  désoxycorticostérone pour obtenir des conditions de compétition entre l'oxydation phosphorylante et la  $11\beta$ -hydroxylation.

L'évolution de chaque nucléotide AMP, ADP et ATP est montrée sur la figure 10 (A), dans le cas du malate. Les courbes de contrôle sont multiphasiques, analogues à celles observées pour les mitochondries de foie de rat (68) :

- dans la première phase (0-15 secondes), l'ADP disparaît très rapidement, avec formation de quantités identiques d'AMP et ATP. Ceci indique l'action de l'adénylate kinase, qui catalyse la réaction



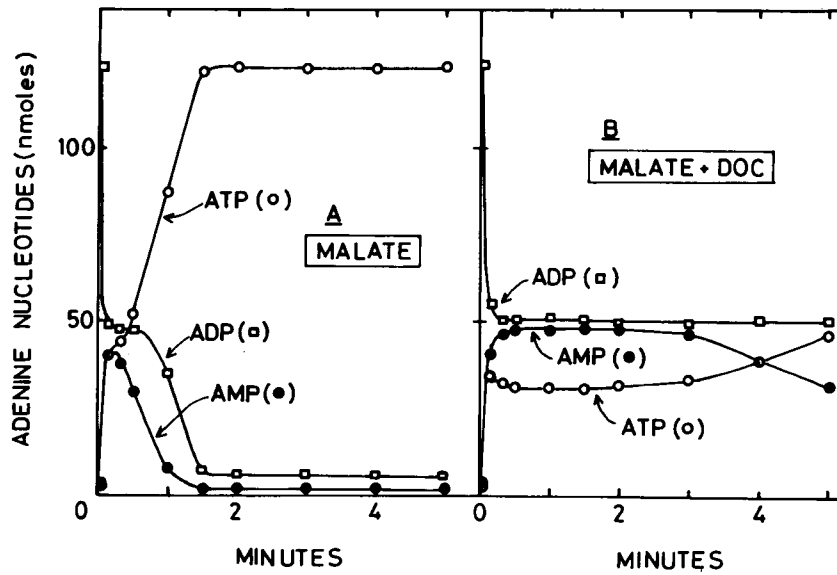


Fig. 10. Cinétique de phosphorylation de l'ADP extramitochondrial: inhibition par la désoxycorticostérone.

Les mitochondries de cortex surrénal (2 mg de protéine) ont été mises en incubation à 25°C dans 0,6 ml de milieu salin isotonique de composition suivante : 0,1 M KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris, 10 mM L-malate, 10 mM phosphate de potassium, 0,26 mM <sup>214</sup>C-ADP. Le pH final est de 7,2. Les incubations sont arrêtées aux temps indiqués par addition d'acide trichloracétique à la concentration finale de 2 %.

La radioactivité contenue dans chacun des adénines nucléotides est mesurée après séparation par chromatographie sur papier.

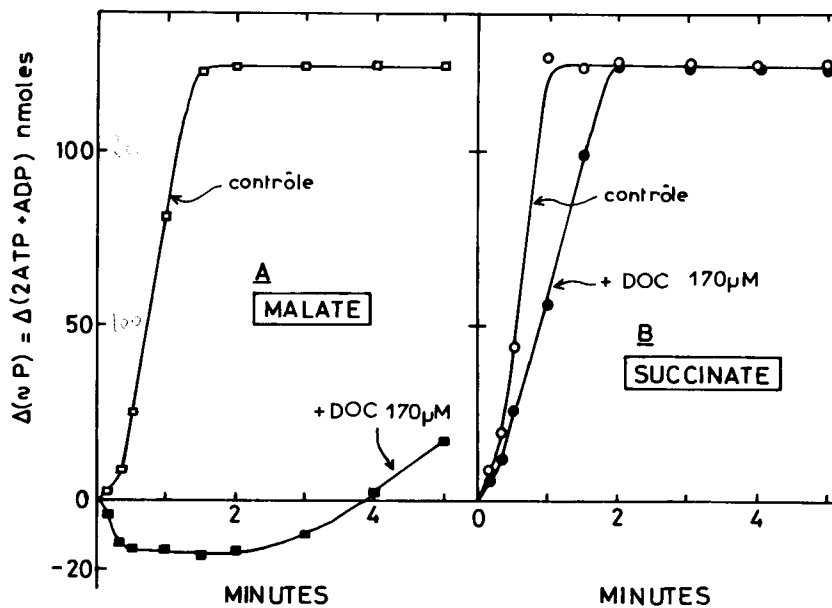


Fig. 11. Malate :

Les données de la figure précédente (fig. 10) sont tracées en fonction de la variation nette des liaisons "riches en énergie" :

$$(\Delta \infty P) = \Delta(2 \text{ ATP} + \text{ADP})$$

Succinate :

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites pour le malate qui est remplacé par du succinate (10 mM).

- après un bref plateau (15-30 secondes), l'ADP et l'AMP sont utilisés pour être phosphorylés en ATP.

En présence de désoxycorticostérone (Fig. 10 (B)), seule la première phase correspondant à l'action de l'adénylate kinase subsiste. L'efficacité de la phosphorylation est appréciée en calculant la variation de la quantité de phosphate estérifié :  $\Delta(\text{ADP} + 2 \text{ ATP})$ , à partir de l'évolution des nucléotides. La figure 11 montre que l'oxydation phosphorylante est inhibée pendant la  $11\beta$ -hydroxylation que le donneur d'équivalents de réduction soit le malate (A) ou le succinate (B). Avec le malate, l'oxydation phosphorylante est abolie complètement, il y a compétition au niveau des pyridines nucléotides réduits : la malate déshydrogénase donne de l'oxaloacétate en régénérant du NADH utilisable par la chaîne respiratoire, l'enzyme malique mitochondrial donne du pyruvate et du NADPH utilisé par la chaîne d'hydroxylation. En présence de stéroïde, la voie de l'enzyme malique est favorisée.

Dans le cas du succinate, l'inhibition est beaucoup moins importante. Cammer et Estabrook (64)-(70) ont postulé néanmoins que les mitochondries de cortex surrénal sont capables de dériver une partie de l'énergie respiratoire pour les réactions d'hydroxylation des stéroïdes. Le succinate provoque un reflux d'électrons dans la région de la NADH déshydrogénase et réduit le pool de NAD en NADH. Une transhydrogénase "énergie-liée" en permet la transformation en NADPH, ce dernier est alors oxydé par la chaîne d'hydroxylation.

En fait, l'analyse de la situation métabolique dans le cas du succinate est plus complexe que dans le cas du malate. Chaque molécule de succinate oxydée fournit du fumarate, lui-même immédiatement transformé en une molécule de malate par la fumarase. Ce malate peut être alors pris comme substrat préférentiel pour la chaîne d'hydroxylation.

Actuellement, malgré de nombreux articles sur ce sujet (60)-(67)-(69)-(70), le problème de l'utilisation des intermédiaires "riches en énergie" lors de la 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes, reste non-résolu.

### 3.4. Cytochromes de mitochondries de cortex surrénal.

Harding et Nelson (8) ont démontré que les mitochondries de cortex surrénal possédaient un cytochrome particulier, le cytochrome P-450, en plus des cytochromes habituels de la chaîne respiratoire. Ce cytochrome, localisé strictement dans le réticulum endoplasmique dans des organes comme le foie ou le rein, est mis en évidence en faisant agir l'oxyde de carbone sur les mitochondries de cortex surrénal réduites. Ce traitement provoque l'apparition d'une bande de Soret à 450 nm, très intense ( $\epsilon = 91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) et contrairement aux autres cytochromes, il n'y a pas de modifications pour les longueurs d'onde plus élevées (bandes  $\alpha$  et  $\beta$ ). Le contenu en cytochromes respiratoires b, c,  $c_1$  et  $a+a_3$ , a été déterminé par Harding et Nelson (8)-(57) puis Cammer et Estabrook (64)-(70). Nous avons reproduit ces mesures, la figure 12 présente un spectre différentiel d'absorption des cytochromes respiratoires réduits par le succinate en présence de 1 mM cyanure contre une référence contenant les cytochromes oxydés. Les bandes  $\alpha$  des cytochromes ( $a+a_3$ ) sont à 605 nm, les bandes  $\alpha$  non-résolues des cytochromes ( $c+c_1$ ) sont à 552 nm et le cytochrome b est visible par l'épaule à 560 nm. Les diverses bandes  $\beta$  des cytochromes sont présentes vers 520 nm. Ce spectre est similaire à ceux des mitochondries de foie de rat (90). Le calcul du contenu en cytochromes de nos préparations est présenté dans la table 3, nos valeurs sont comparées aux chiffres publiés par les équipes de Harding et de Estabrook (57)-(70).

Nos propres résultats sont très voisins de ceux de Cammer et Estabrook (64)-(70), en particulier les valeurs relatives des divers cytochromes par rapport au cytochrome P-450.

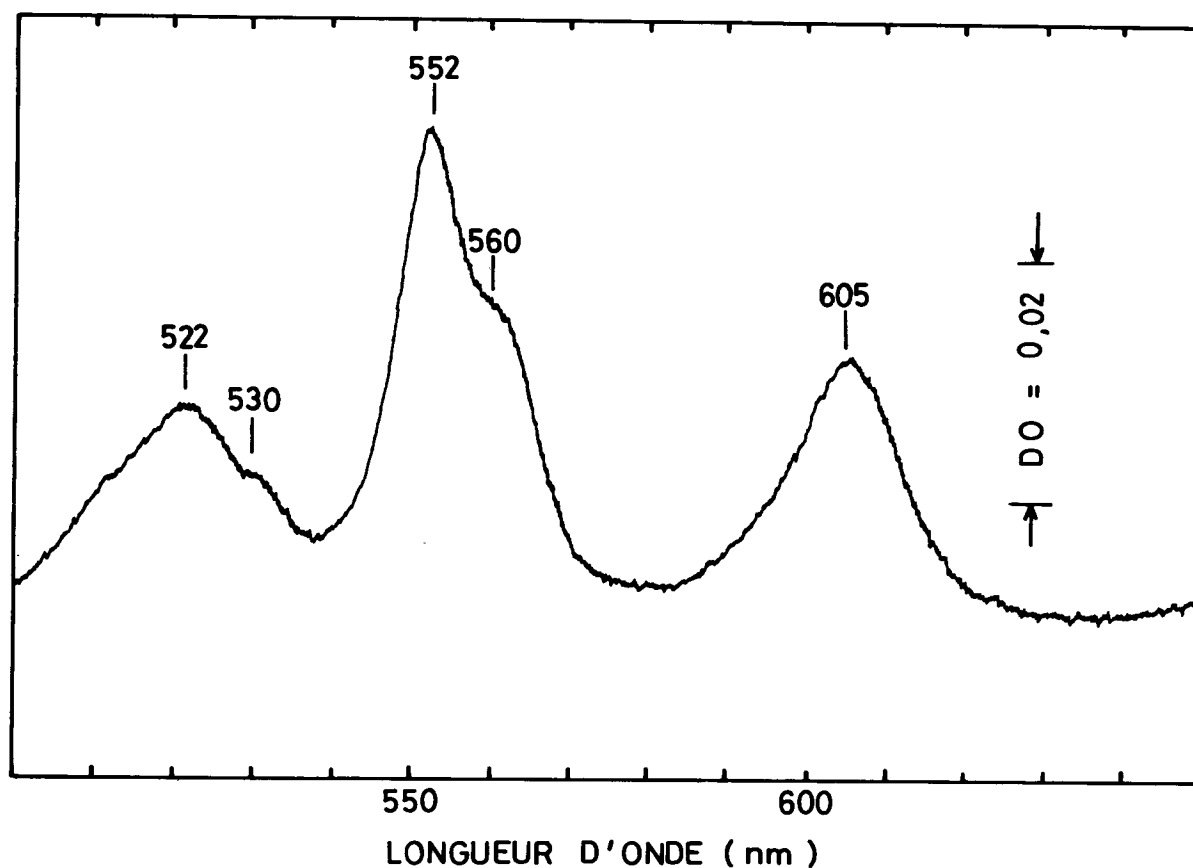


Fig. 12. Spectre des cytochromes respiratoires des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Les mitochondries de cortex surrénal (8,7 mg/ml) sont réparties dans deux cuvettes de spectrophotomètre. Dans la cuvette test, les cytochromes sont réduits par le succinate (20 mM) en présence de cyanure de potassium (1 mM). Aucun additif est fait dans la cuvette témoin (oxydé).

Le spectre est enregistré de 650 à 500 nm sur le spectrophotomètre CARY 15 (échelle étalée 0 - 0,1).

**TABLEAU 3**

Contenu en cytochromes  
des mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Cytochrome	Longueurs d'onde de mesure (nm)	Coefficient d'absorption $\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Cammer et Estabrook (64)		Harding et Nelson (8)		ce travail	
			nmole/mg	cyt/cyt P-450	nmole/mg	cyt/cyt P-450	nmole/mg	cyt/cyt P-450
a + a <sub>3</sub> b c + c <sub>1</sub>	605 - 625	16	0,23	0,15	0,22	0,42	0,15	0,14
	562 - 575	20	0,17	0,11	0,26	0,50	0,13	0,12
	551 - 540	19	0,29	0,19	0,16	0,31	0,20	0,18
P-450 (CO)	450 - 490	91	1,5	1	0,52	1	1,1	1



Le contenu en cytochrome P-450 est supérieur à la somme des cytochromes respiratoires. L'intensité du spectre P-450 (CO) est telle que l'absorption du complexe cytochrome  $a_3$  (CO) n'est pas apparente.

### 3.5. Estimation de la densité des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Les mitochondries de cortex surrénal de boeuf ont été déposées sur un gradient de densité constitué par 10 couches de saccharose (densité variant de 1,05 à 1,20). Des centrifugations de 30 minutes, 1 heure et 2 heures ont été effectuées. Les mitochondries de cortex surrénal sédimentent rapidement et forment une bande de densité moyenne 1,14 qui reste stable en fonction des différents temps de centrifugation. Cette valeur de densité sera utilisée plus loin, lors de la séparation des membranes mitochondriales (Chapitre III). Des mitochondries de foie de rat mélangées à celles de cortex surrénal semblent sédimenter après 30 minutes à une densité apparente de 1,18 mais elles ne sont pas à l'équilibre et elles forment progressivement un culot au fond du tube de centrifugation. Beaufay et al (71) ont mesuré une densité d'équilibre de 1,24 pour des mitochondries de foie de rat.

### CHAPITRE III

#### SEPARATION DES MEMBRANES DES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

##### 1. INTRODUCTION.

###### 1.1. Méthodes de séparation des membranes mitochondriales.

A partir de 1966, diverses méthodes ont été mises au point, permettant d'isoler les membranes externes et internes des mitochondries.

La première méthode a été proposée par Parsons et al. (72)-(75), elle utilise un gonflement en tampon phosphate hypotonique. Elle découlait d'observations au microscope électronique de l'effet d'un gonflement de grande amplitude sur les membranes mitochondriales (91)-(92). La membrane interne repliée sur elle-même (crêtes) peut gonfler largement et place sous tension la membrane externe qui se déchire. Les morceaux de cette dernière se détachent de la membrane interne et reforment des vésicules de petite taille. Des centrifugations différentielles préliminaires suivies par une centrifugation en gradient de densité ont permis à Parsons et al. (72)-(75) d'isoler des fractions purifiées de membranes externes et internes.

Un procédé plus élaboré, améliorant le rendement en membranes purifiées, publié par Sottocasa et al. (29)-(76), utilise le même principe. Le gonflement en milieu hypotonique est suivi d'une étape de contraction en présence d'ATP et de magnésium, puis d'une sonication douce pour faciliter la libération des morceaux de membrane externe.

Une technique très efficace a été développée par Lévy et al. (77)-(79). Elle utilise l'action en milieu isotonique de faibles concentrations de digitonine qui détachent spécifiquement la membrane externe, elle a été largement développée par Schnaitman et al. (80)-(82).

### 1.2. Localisations enzymatiques.

Les diverses méthodes signalées ci-dessus ont permis l'identification d'activités enzymatiques caractéristiques de chacune des deux membranes mitochondriales. Les enzymes de référence le plus généralement définies sont les suivantes :

- pour la membrane interne : cytochrome c oxydase, succinate deshydrogénase.
- pour la membrane externe : NADH cytochrome c réductase (insensible à la roténone), cytochrome  $b_5$  et monoamine oxydase (benzylamine oxydase, tryptamine oxydase).
- pour la matrice mitochondriale : enzymes du cycle de Krebs: malate deshydrogénase, par exemple.
- pour l'espace intermembranaire : adénylate kinase.

Les trois méthodes décrites ci-dessus conduisent à des distributions enzymatiques identiques et cohérentes avec toutes les études antérieures sur les mitochondries intactes. Elles confirment le rôle majeur du compartiment membrane interne plus matrice où sont localisés la chaîne respiratoire, les systèmes de synthèse d'ATP et les enzymes du cycle de Krebs. Parsons et al (72)-(75) et Sottocasa et al. (29)-(76) ont souligné les points de similitude et les différences entre la membrane externe mitochondriale et les membranes du reticulum endoplasmique. Néanmoins, en raison de la diversité des enzymes caractéristiques (monoamine oxydase, cynurénine hydroxylase, cytochrome  $b_5$ , ...), le rôle fonctionnel exact de la membrane externe mitochondriale n'est toujours pas défini.

L'impact des méthodes de séparation des membranes mitochondriales a été très net et les progrès dans le domaine des localisations submitochondriales ont été rapides : il n'est pas exagéré de considérer, à ce jour, que la distribution de pratiquement tous les enzymes mitochondriaux connus a été examinée.

La généralité des techniques de séparation est démontrée par le fait qu'elles se sont avérées efficaces dans leurs formes originales ou légèrement modifiées, pour la séparation des membranes des mitochondries de coeur (83), de rein (84), de cerveau (85), de pomme de terre (86), de *Neurospora crassa* (87) ou de *Saccharomyces cerevisiae* (88)-(89).

Nous concluerons cette introduction sur la séparation des membranes mitochondriales en signalant les controverses qui ont agité ce sujet au cours des années 1966-1970. L'équipe de Green avait publié une série de méthodes en vue de la séparation des membranes mitochondriales : action des ultra-sons, détergents, phospholipase A, diethylstilboestrol, ... Ces méthodes, très drastiques, avaient conduit le groupe de Green (93)-(94) à des localisations enzymatiques opposées à celles de toutes les autres équipes : en particulier, le cycle de Krebs, le site d'action de l'attractylate étaient situés dans la membrane externe. Ces résultats, immédiatement critiqués, ont néanmoins fait l'objet de plus de quinze publications (articles, méthodes, revues, ...) introduisant une polémique et une confusion certaine dans le domaine des localisations submitochondriales. Une analyse critique de l'ensemble des résultats de l'équipe de Green a été présentée en 1969 par Ernster et Kuylenstierna (47) et par d'autres auteurs (95)-(96). Plus récemment, le groupe de Green est revenu sur l'ensemble des affirmations originales et leurs résultats actuels sont en accord total avec ceux des autres groupes (97)-(98).

## 2. TECHNIQUE DE SEPARATION DES MEMBRANES DE MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF PAR LA METHODE DE PARSONS (72)-(75).

La méthode utilisée a été celle de Parsons (72)-(75) schématisée sur la figure 13.

Les mitochondries sont diluées à 0°C dans du tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7,4. Le volume de tampon phosphate est choisi pour que la concentration en protéines soit de 1 à 2 mg/ml. Après 15 minutes à 0°C, les mitochondries gonflées sont centrifugées 20 min. à 100 000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est homogénéisé dans un volume de tampon phosphate identique au précédent. La suspension est alors centrifugée à 2 000 g pendant 15 min. et le culot résultant (culot "basse vitesse") est enrichi en membranes internes. Le surnageant est centrifugé à 100 000 g pendant 20 min. et le culot obtenu (culot "haute vitesse") est enrichi en membranes externes. Les deux fractions enrichies sont purifiées par centrifugation sur un gradient discontinu de saccharose. Ce dernier a dû être modifié par rapport à la technique originale pour tenir compte de la densité plus faible des mitochondries de cortex surrénal ( $d = 1,14$ ). Il est constitué par 3 ml de saccharose 40 %, 3 ml de saccharose 30 %, 3 ml de saccharose 15 % et 1 ml de suspension membranaire (5 à 15 mg de protéine). Toutes les solutions de saccharose (%=poids/volume) sont faites dans le tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7,4. Les gradients sont centrifugés pendant 1 heure à 0°C dans le rotor Beckman-Spinco SW-41 à 39 000 tours par minute (250 000 g). Le culot et le matériel membranaire rassemblés à l'interface des solutions de saccharose 15 et 30 % sont collectés séparément, dilués par au moins quatre volumes de tampon phosphate 20 mM pH 7,2 pour diminuer la densité des solutions, et centrifugés pendant 1 heure dans le rotor Beckman-Spinco SW 41 à 39 000 tours par minute (250 000 g). Comme il sera montré plus loin, les deux fractions, légère et lourde, correspondent respectivement à la membrane externe et à la membrane interne (+ matrice).

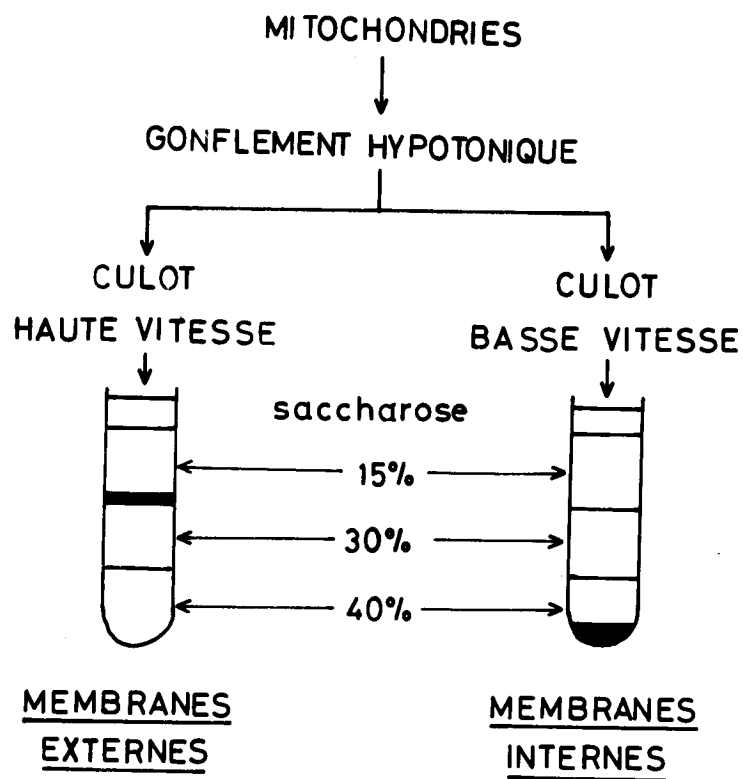


Fig. 13. Schéma de la préparation des membranes mitochondriales du cortex surrénal de boeuf selon Parsons et al. (72).

Dans un but de comparaison avec les propriétés des membranes mitochondriales, les microsomes sont traités par le tampon phosphate de sodium 20 mM pH 7,4 à 0°C, d'une façon identique aux mitochondries.

Après centrifugation sur gradient de saccharose, les microsomes se séparent en 4 fractions : deux fractions mineures, une sédimentant au niveau du premier interface (dépôt - saccharose 15 %) et une autre au fond du tube ; les deux fractions principales se rassemblent aux niveaux des second et troisième interfaces du gradient. Les membranes microsomales sédimentant à l'interface 15 % - 30 % saccharose (caractéristique des membranes externes) sont collectées et centrifugées après dilution par le tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7,4.

### 3. CARACTERISTIQUES DES MEMBRANES EXTERNES ET INTERNES DES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

#### 3.1. Caractères biochimiques des membranes mitochondriales de cortex surrénal de boeuf.

Les fractions membranaires isolées par la méthode de Parsons et al. (72) à partir des mitochondries isolées de cortex surrénal de boeuf présentent des différences significatives portant sur le contenu phospholipidique, les activités enzymatiques et la capacité de 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes. Les résultats sont rassemblés sur la table 4. La fraction mitochondriale légère (d = 1,08) a un contenu phospholipidique élevé, des activités enzymatiques cytochrome c oxydase et malate deshydrogénase faibles, par contre une activité tryptamine oxydase élevée. La fraction mitochondriale plus lourde (d = 1,16) que les mitochondries a des caractéristiques inverses ; les activités cytochrome c oxydase et malate deshydrogénase sont élevées.

TABLEAU 4

Caractéristiques de diverses fractions membranaires  
du cortex surrénal de boeuf :  
fractionnement submitochondrial

Fraction	Densité	Phospho- lipides**	Cyt. c oxydase.*	Malate de- hydrogénase	Tryptamine oxydase (MAO)*	11β-hydro- xylase*	Cytochrome P-450*
Mitochondries	1,14	426	2 200	7 380	0,096	4,0	1,02
Membranes in- ternes + ma- trice	1,16	461	3 270	10 400	0,102	4,4	1,31
Membranes externes.	1,08	1 130	117	140	2,57	0,55	0,09
Microsomes	-	645	316	-	0,080	0	0,39
Pi-microsomes	-	-	224	-	0,114	-	0,42

\* Cytochrome c oxydase en nmoles cytochrome c oxydé/min/mg de protéine ; malate déshydrogénase en nmoles NADH<sub>2</sub> oxydé/min/mg de protéine ; tryptamine oxydase en nmoles tryptamine oxydé/min/mg de protéine ; 11β-hydroxylase en nmoles corticostérone/min/mg de protéine ; cytochrome P-450 en nmoles/mg de protéine.

\*\* Phospholipides en nmoles phospholipides/mg de protéine.



Le contenu phospholipidique et l'activité tryptamine oxydase sont plus faibles sur ceux de la bande légère mais sont équivalents ou même légèrement supérieurs à ceux des mitochondries : ce dernier point sera discuté plus loin.

La cytochrome c oxydase et la monoamine oxydase sont des enzymes caractéristiques, la première de la membrane interne, la seconde de la membrane externe des mitochondries de foie de cobaye (72) et de rat (80). Par analogie, nous pouvons admettre que la fraction légère correspond à la membrane externe mitochondriale alors que la fraction lourde correspond à la membrane interne mitochondriale. Les membranes du réticulum endoplasmique en particulier celles sédimentant au même interface que les membranes externes dans le gradient de purification (Pi - microsomes) ont des activités cytochrome c oxydase et monoamine oxydase faibles. L'absence d'activité monoamine oxydase élevée dans les microsomes (et Pi - microsomes) montre que la fraction légère isolée à partir des mitochondries n'est pas simplement une contamination des mitochondries de départ par des membranes du réticulum endoplasmique. L'enzyme caractéristique choisi pour identifier la membrane externe n'est pas présent dans la fraction microsomale du cortex surrénal de boeuf.

### 3.2. Caractères morphologiques des membranes mitochondriales de cortex surrénal de boeuf.

Les résultats biochimiques exposés ci-dessus et montrant une séparation des membranes externes et internes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf ont été confirmés par des examens morphologiques au microscope électronique.

#### a) Membranes internes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

L'étude au microscope électronique des coupes minces d'inclusions de membranes internes, montre des vésicules de taille moyenne (1,2 microns), grossièrement sphériques.

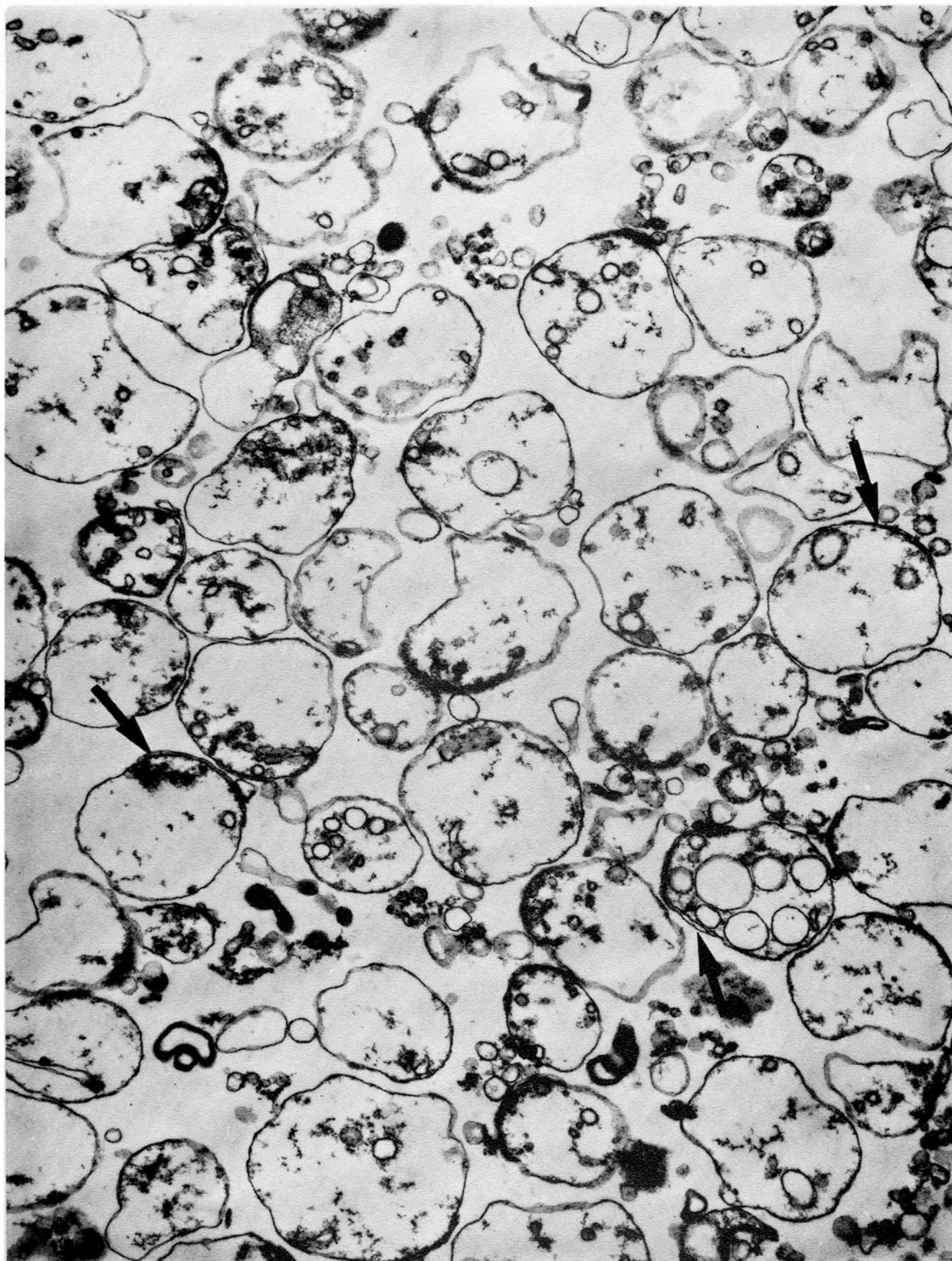


Fig. 14. Coupe mince des membranes internes  
des mitochondries de cortex surrénal de boeuf

La plupart des vésicules n'ont qu'une membrane limitante, néanmoins des fragments de membrane externe demeurent attachés à certaines membranes internes (↑) (x 24 000).

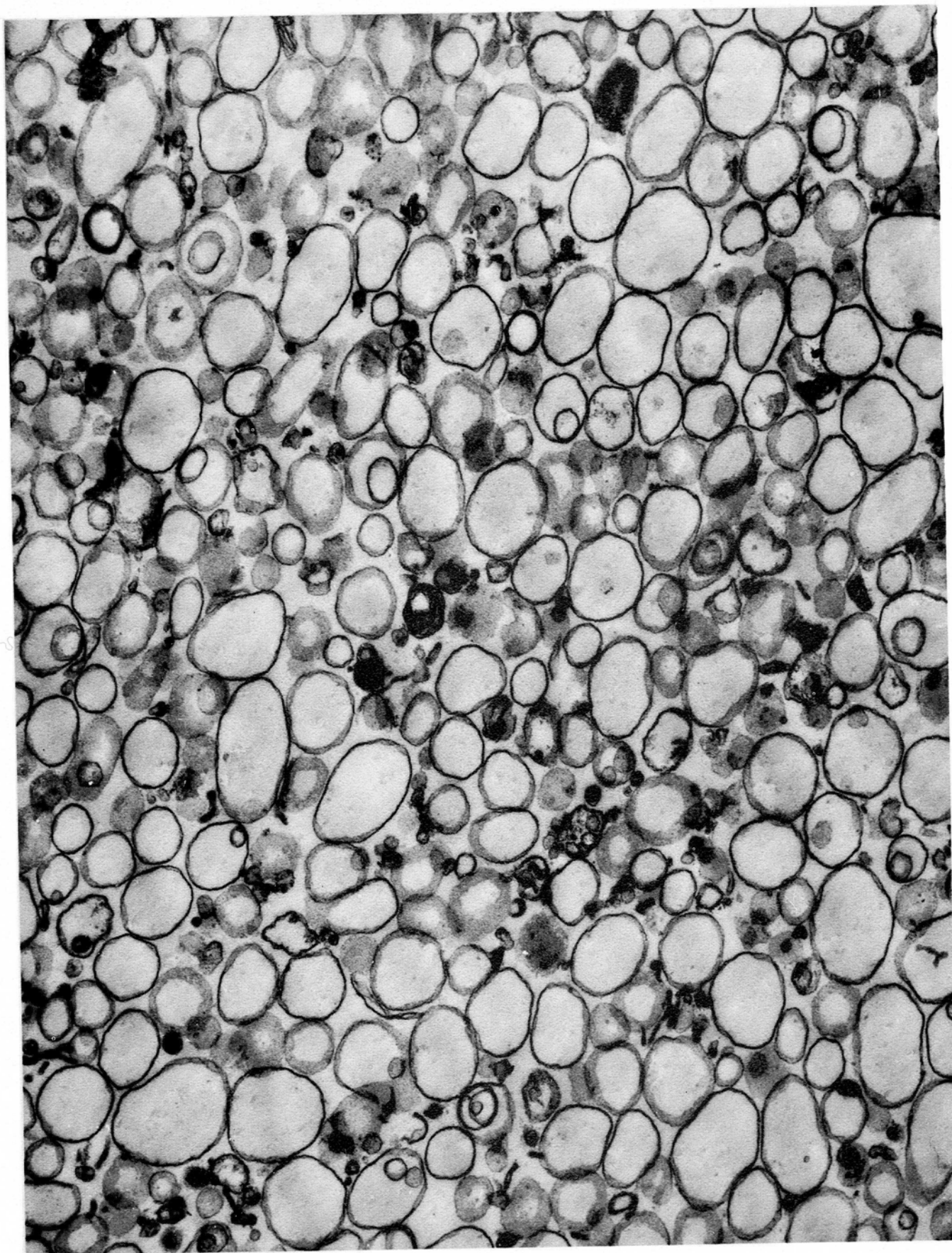


Fig. 15. Coupe mince des membranes externes purifiées  
des mitochondries de cortex surrénal de boeuf  
(x 24 000)



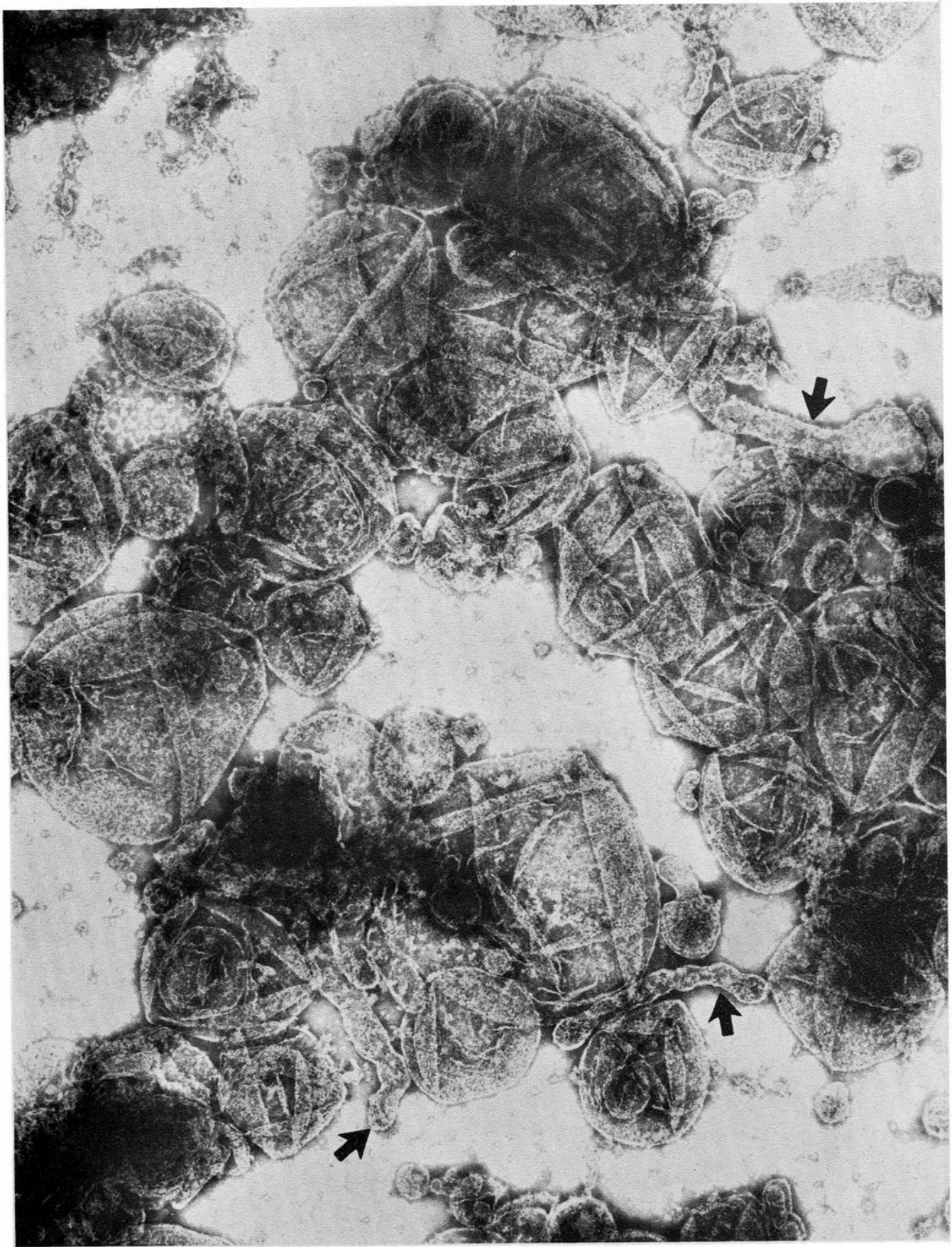


Fig. 16. Membranes externes  
des mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Apparence en "sac fripé" des membranes externes purifiées des mitochondries de cortex surrénal de boeuf après coloration négative par le phosphotungstate de potassium et fixation par l'acide osmique. Des vésicules de reticulum endoplasmique sont visibles (↑) (x 66 000).

Elles contiennent des structures granulaires et des petites vésicules correspondant aux restes des crêtes. A part ces dernières le matériel matriciel est dilué et le contenu apparaît vide. Des fragments de membrane externe sont encore attachés sur des portions de la membrane interne, néanmoins la majorité des vésicules de membrane interne n'ont qu'une membrane limitante. (Fig. 14). Ces électromicroscopies sont analogues à celles publiées antérieurement sur la structure des membranes internes des mitochondries de foie (72)-(99).

b) Membranes externes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf. Comparaison avec les microsomes de cortex surrénal.

L'aspect des coupes minces des inclusions de membranes externes montre une population de vésicules transparents aux électrons, assez uniformes et de petite taille (0,3 à 0,5  $\mu$ ) (Fig.15). Ce sont des fragments de membrane externe qui se sont refermés sur eux-mêmes. Les contours flous de sections de nombreuses membranes externes sont dûs à la petite taille des vésicules qui provoque un nombre important de coupes tangentielles. Les vésicules sont limités par une seule membrane et ne présentent aucun détail d'organisation interne. Morphologiquement, les membranes externes se rapprochent des vésicules de reticulum endoplasmique.

Ces électromicroscopies sont similaires à celles publiées pour les membranes externes des mitochondries de foie (72)-(99).

L'apparence atypique des coupes minces contraste avec la morphologie très caractéristique, en sac fripé, après fixation par l'acide osmique et coloration négative par le phosphotungstate de potassium, pH 7,2 (Fig. 16). Cette structure correspondant à l'observation originale de Parsons et al. (72) est spécifique des membranes externes mitochondriales. Elle n'a jamais été décrite pour d'autres fractions membranaires subcellulaires, mais par contre, elle a été obtenue pour les membranes externes des mitochondries de rein (84), et de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (89), en plus des mitochondries de foie (72).

La principale contamination des membranes externes est constituée par du réticulum endoplasmique reconnaissable à sa morphologie tubulaire.

3.3. Localisation submitochondriale du système de 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes et du cytochrome P-450 du cortex surrénal de boeuf.

Les résultats enzymatiques et morphologiques décrits ci-dessus permettent de déduire la localisation spécifique du cytochrome P-450 et du système de 11 $\beta$ -hydroxylation de la désoxycorticostérone dans la membrane interne des mitochondries de cortex surrénal de boeuf (table 4 et Fig. 17). Le pic observé à 416 nm dans la fraction de membranes externes est vraisemblablement provoqué par de l'hémoglobine adsorbée.

3.4. Essai de purification de la membrane interne mitochondriale obtenue par la méthode de Parsons et al (72).

La fraction des membranes internes mitochondriales décrite précédemment reste très contaminée par des membranes externes comme l'atteste, d'une part, la persistance d'une activité monoamine oxydase élevée, et d'autre part les clichés de microscopie électronique. Parsons et al. (72) avaient suggéré qu'un double gradient de purification pourrait peut-être améliorer la pureté de la fraction correspondant aux membranes internes mitochondriales. Ce procédé que nous avons essayé, s'est avéré inefficace avec les mitochondries de cortex surrénal de boeuf, comme le montre le schéma 18. Au contraire, après le deuxième passage sur gradient de densité, la monoamine oxydase du culot de membranes internes augmente mais l'accroissement parallèle de la cytochrome c oxydase indique que cela est dû à la perte d'une partie des protéines solubles de la matrice mitochondriale.

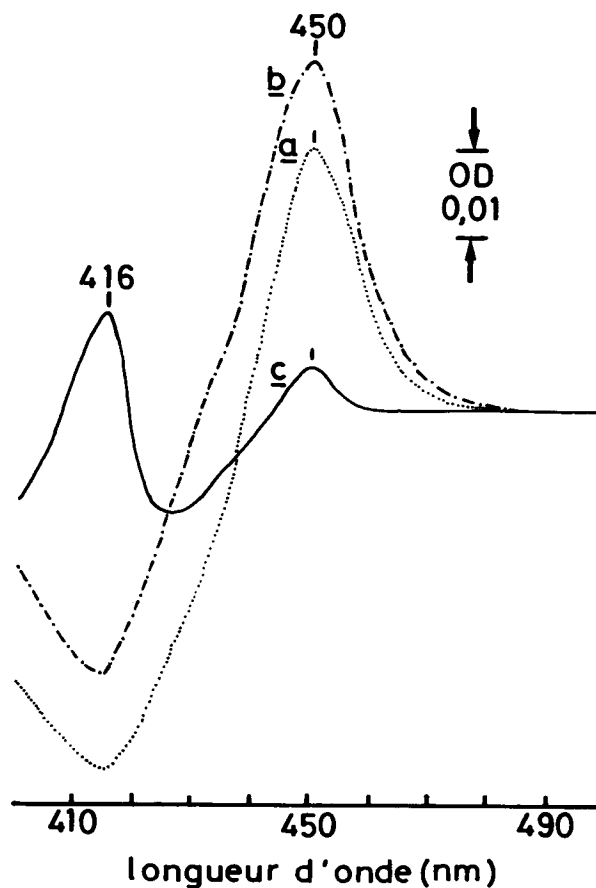


Fig. 17. Spectre différentiel du cytochrome P-450 réduit combiné avec l'oxyde de carbone dans diverses fractions mitochondriales

a : mitochondries (0,3 mg protéine/ml).

b : membranes internes (0,3 mg protéine/ml).

c : membranes externes (0,6 mg protéine/ml).

Les fractions sont réduites par le dithionite de sodium.

Les spectres sont enregistrés de 400 nm à 500 nm sur le spectrophotomètre CARY 15 (Echelle étalée 0 - 0,1).

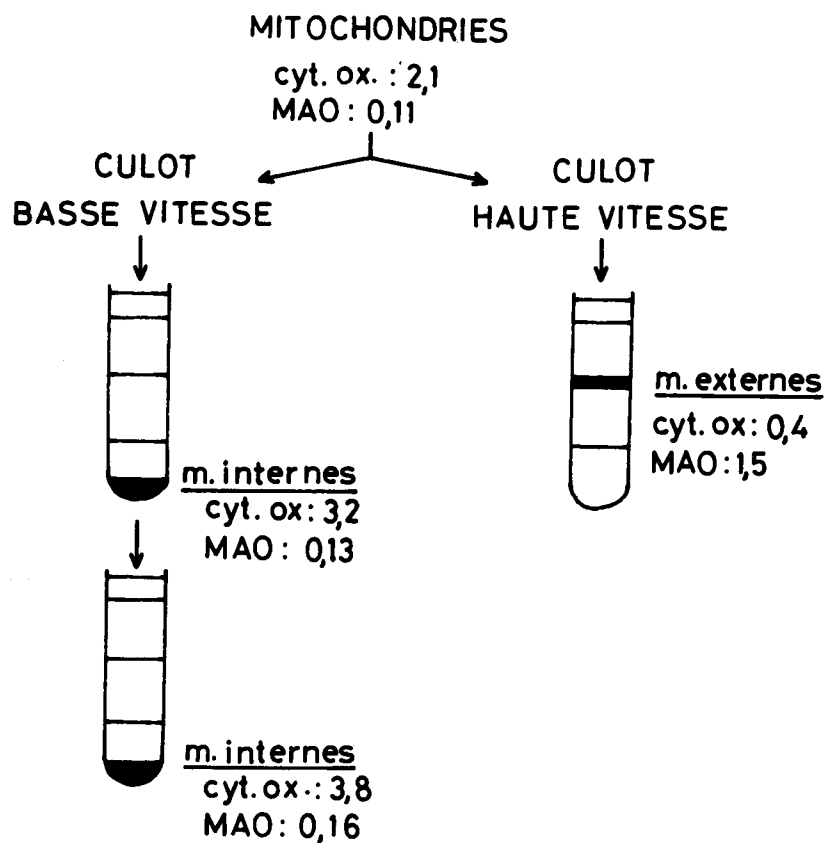


Fig. 18. Purification des membranes internes mitochondriales  
obtenues par la méthode de Parsons et al (72)

L'effet d'un double gradient de purification a été suivi grâce aux enzymes caractéristiques de la membrane externe : tryptamine oxydase (MAO : nmoles/min/mg de protéine) et de la membrane interne : cytochrome c oxydase (cyt c ox. :  $\mu$ moles/min/mg de protéine).



Cette expérience écarte un simple entraînement mécanique de morceaux de membranes externes dans le culot des membranes internes, mais indique une liaison solide entre les deux membranes. La membrane externe ne se détache efficacement que pendant la phase dynamique du gonflement des mitochondries.

### 3.5. Discussion.

La séparation des membranes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf a été obtenue par la technique de Parsons et al (72), décrite par ces auteurs pour les mitochondries de foie. La localisation du système de la 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes et du cytochrome P-450 dans la membrane interne est en accord avec les données morphologiques et biochimiques antérieures. Par exemple, la forme particulière de membrane interne des mitochondries de cortex surrénal et les effets de l'ACTH sur le maintien de cette morphologie constituaient des indices pour localiser les systèmes spécialisés d'hydroxylation des stéroïdes dans la membrane interne mitochondriale (2)-(52). Un autre argument est le fait que le NADPH exogène n'est pas capable de supporter efficacement l'hydroxylation des stéroïdes, sauf en présence de calcium qui supprime l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale. Les intermédiaires du cycle de Krebs (malate, succinate, isocitrate, ...) sont par contre, de bons donneurs d'équivalents-réducteurs pour la 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes (1)-(11)-(12).

Les interactions métaboliques entre la respiration et l'hydroxylation sont clairement expliquées par la présence simultanée dans la membrane interne des mitochondries de cortex surrénal des systèmes d'hydroxylation de stéroïdes et de la chaîne respiratoire.

Diverses enzymes de la biosynthèse des stéroïdes sont localisées dans le reticulum endoplasmique ou le cytoplasme adjacent et pendant la biosynthèse des corticostéroïdes (corticostérone, cortisol), les stéroïdes intermédiaires doivent pénétrer et sortir de la mitochondrie au moins deux fois :

une première fois pour le clivage de la chaîne latérale du cholestérol,

et une seconde fois pour la 11 $\beta$ -hydroxylation.

Ces derniers systèmes enzymatiques sont associés à la membrane interne. Les stéroïdes doivent donc pénétrer la membrane externe avant d'interagir avec la membrane interne mitochondriale. Dans le chapitre IV nous examinerons quelques caractéristiques de cette interaction.

Nous avons souligné précédemment la persistance d'une activité monoamine oxydase importante dans la fraction membrane interne isolée par la méthode de Parsons et al. (72). En effet, la totalité de la membrane externe n'est pas détachée, et d'autre part, une partie des protéines solubles de la matrice mitochondriale est libérée lors du gonflement dans le tampon phosphate hypotonique. Cette perte des protéines solubles aboutit à un enrichissement relatif en "membranes" ; la monoamine oxydase n'étant localisée que dans la fraction membranaire, son activité spécifique ne diminue pas bien que la majeure partie des membranes externes soient absentes. La méthode de Parsons et al. (72) fournit donc des membranes externes très purifiées non contaminées par de la membrane interne, par contre les membranes internes sont encore contaminées par des fragments de membranes externes. Cette particularité avait d'ailleurs déjà été signalée par Parsons et al. (72) ; elle est très apparente dans le tableau ci-après :

Distribution des enzymes caractéristiques dans les  
membranes purifiées des mitochondries de foie  
Résultats de Parsons et al (72).

	cytochrome aa <sub>3</sub> nmoles/mg	cytochrome b <sub>5</sub> protéines
mitochondries	0,105	0,064
membranes externes	0,019	0,60
membranes internes	0,25	0,21

Les cytochromes aa<sub>3</sub> et b<sub>5</sub> sont les cytochromes caractéristiques des membranes internes et externes respectivement. Le cytochrome b<sub>5</sub> caractéristique des membranes externes est néanmoins 3 fois plus concentré dans les membranes internes que dans les mitochondries de départ.

Nous n'avons pas testé la méthode de Sottocasa et al. (29) (76) sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf car son principe est strictement analogue à celui de la méthode de Parsons et al. (72) et les résultats originaux montrent que l'amélioration sensible de la pureté des membranes internes se fait au détriment de la contamination des membranes externes.

Distribution des enzymes caractéristiques dans les  
membranes purifiées des mitochondries de foie  
Résultats de Sottocasa et al. (29) (76).

	cytochrome c oxydase	NADH cytochrome c réductase insensible à la roténone
	μmoles/min/mg protéine	
mitochondries	0,742	0,390
membranes externes	0,719	0,097
membranes internes	1,310	3,040

Dans le tableau ci-dessus donné par Sottocasa et al. (29) (76), la cytochrome c oxydase et la NADH cytochrome c réductase (insensible à la roténone) ont été choisies comme enzymes marqueurs de la membrane interne et de la membrane externe respectivement. On peut voir que l'activité spécifique de la cytochrome c oxydase des membranes externes obtenues par la technique de Sottocasa et al. (29) est aussi élevée que dans les mitochondries de départ.

Nous montrerons plus loin qu'un traitement par la digitonine (77) (82) permet d'obtenir des membranes internes très purifiées à partir des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Ces remarques n'invalident pas les localisations obtenues, l'absence de système de 11β-hydroxylation des stéroïdes et de cytochrome P-450 dans la membrane externe purifiée est une preuve suffisante de leur présence dans la membrane interne des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Les densités des membranes isolées externes et internes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf ( $d = 1,08$  et  $1,16$ ) sont plus faibles que celles des mitochondries de foie de cobaye ( $d = 1,13$  et  $1,21$ ), mais sont pratiquement identiques aux valeurs publiées pour les membranes externes et internes des mitochondries de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (89) ( $d = 1,08$  et  $1,19$ ).

La méthode de Parsons et al (72) fournissant une membrane externe assez purifiée, il est possible de calculer approximativement la contribution de la membrane externe par rapport aux protéines totales de la mitochondrie. Le quotient des activités spécifiques (act. spé.) de la tryptamine oxydase dans la mitochondrie entière et dans les membranes externes purifiées donne une limite supérieure du pourcentage protéique constitué par les membranes externes :

$$\frac{\text{(act. spé. mitochondrie)}}{\text{(act. spé. membranes externes)}} \times 100$$

= % protéines totales contenues dans la fraction membranes externes.

Les membranes externes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf ne constituent pas plus de  $(0,096/2,57) \times 100 = 3,7$  % des protéines mitochondriales totales. Cette valeur est plus faible que chez les mitochondries de foie de rat : 6 - 10% (82) moins riches en membranes internes. Elle est conforme aux mesures quantitatives en microscopie électronique de Yago et al. (49) dans le cortex surrénal.

Des localisations submitochondriales identiques à celles que nous avons observées (153) ont été décrites simultanément par d'autres groupes de chercheurs japonais, américains et italiens :

sur les mitochondries de cortex surrénal de porc par Yago et Ichii (101),  
de rat par Dodge et al. (102),  
de boeuf par Sottocasa et Sandri (43).

Des particularités mineures distinguent les activités enzymatiques dans les divers types de mitochondries : par exemple, les mitochondries de cortex surrénal de porc ont une activité benzylamine oxydase élevée, alors que nous n'avons pas pu mesurer spectrophotométriquement, à 250 nm, la monoamine oxydase des mitochondries de cortex surrénal de boeuf avec la benzylamine comme substrat.

En 1971, Billiar et al (103) utilisant la digestion des mitochondries de cortex surrénal de boeuf par la phospholipase A de venin de serpent, ont localisé à tort le système de  $11\beta$ -hydroxylation des stéroïdes dans la "membrane externe" mitochondriale. Tout comme pour les mitochondries de coeur ou de foie, la méthode de Green et al. (93) (94) ne fournit pas une séparation effective des membranes, mais ne provoque qu'une perturbation drastique des membranes mitochondriales avec libération du matériel matriciel (une discussion plus complète de ce problème a déjà été donnée dans l'introduction du chapitre).

#### 4. PREPARATION DES MEMBRANES INTERNES PURIFIEES DES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF : TRAITEMENT PAR LA DIGITONINE.

Nous avons discuté dans un paragraphe précédent, le fait que la méthode de séparation des membranes mitochondriales par le gonflement de grande amplitude en milieu phosphate hypotonique, fournissait des membranes externes purifiées mais par contre des membranes internes assez impures. Ce point avait déjà été signalé par les auteurs de la méthode, Parsons et al. (72), pour les mitochondries de foie de cobaye.

La méthode de fractionnement des mitochondries par la digitonine proposée par Lévy et al. (77)-(79) et largement développée ultérieurement par Schnaitman et al. (80)-(83) permet d'obtenir des membranes internes de mitochondries de foie de rat très purifiées ; en revanche, les membranes externes sont impures comme le montre le tableau ci-dessous :

Distribution des enzymes caractéristiques dans les membranes purifiées des mitochondries de foie de rat.

Résultats de Schnaitman et al. (81).

	cytochrome c oxydase nmoles/min/mg protéine	monoamine oxydase
mitochondries	1980	22,2
membranes externes	1890	340
membranes internes	2230	1,6

Le procédé de fractionnement par la digitonine a de plus l'avantage de n'utiliser ni des milieux hypotoniques (gonflement) ou hypertoniques (gradients de purification). Nous avons cherché les conditions d'utilisation de la digitonine pour obtenir des membranes internes purifiées des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

4.1. Traitement des mitochondries de cortex surrénal de boeuf par la digitonine : activités enzymatiques.

Le tableau 5 montre le résultat d'une expérience où a été étudiée l'action de concentrations croissantes de digitonine sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf. Il donne les activités enzymatiques contenues dans les mitochondries non traitées et dans les mitochondries traitées par la digitonine, centrifugées à 9000 g pendant 10 minutes et lavées une fois en resuspendant les culots dans du saccharose isotonique, pH 7,2 et recentrifugeant à 9000 g pendant 10 minutes.

TABLEAU 5

Action de la digitonine  
sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf  
Activités enzymatiques de la fraction  
recueillie par centrifugation à 9 000 g, 10 min

Digitonine ***	Cytochrome c oxydase *	Fumarase *	Cytochrome P-450 **	Adénylate kinase *	Monoamine oxydase *
0	3 200	700	0,8	300	0,15
0,13	4 000	1 000	0,8	300	0,17
0,63	3 900	1 900	0,8	60	0,02
1,30	3 900	1 500	1,3	30	0,01
2,5	3 500	1 000	1,2	0	0,01

\* Toutes les activités spécifiques sont en nmoles/min/mg protéine.

\*\* Cytochrome P-450 en nmoles/mg protéine.

\*\*\* Digitonine en mg/mg protéine.



Par rapport au contrôle, les mitochondries traitées par la digitonine montrent une augmentation des activités de la cytochrome c oxydase, fumarase et du contenu en cytochrome P-450. L'adénylate kinase et la monoamine oxydase se comportent tout à fait différemment : leurs activités spécifiques diminuent dans les mitochondries traitées. La chute d'activité observée est en raison directe de la concentration en digitonine. L'adénylate kinase, enzyme située dans l'espace intermembranaire (81) est relâchée dans le milieu. La baisse de l'activité spécifique de la monoamine oxydase est provoquée par le fait que les fragments de membrane externe détachés par l'action de la digitonine ne sont pas sédimentés par centrifugation à 9000 g pendant 10 minutes.

#### 4.2. Action de la digitonine sur la structure des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Le cliché 19 montre l'aspect du sédiment à 9000 g, 10 mn provenant des mitochondries traitées par une concentration suboptimale de digitonine (0,13 mg/mg de protéine). Il présente surtout des mitochondries condensées dont la membrane externe est ouverte et seulement légèrement détachée. De nombreuses structures cylindriques de petite taille très opaques aux électrons sont visibles, elles sont caractéristiques de l'action de la digitonine sur les mitochondries et représentent peut-être des complexes digitonine-cholestérol (79). Aux concentrations optimales en digitonine (0,6 mg digitonine/mg protéine)-(cliché 20), les membranes externes de toutes les mitochondries sont détachées, les membranes internes très condensées apparaissent sous forme d'un lacis tubulaire. Certaines membranes internes sont gonflées. Ces images sont similaires à celles publiées pour les mitochondries de foie de rat (81). L'homogénéité de la préparation de membranes internes est facilement mise en évidence par suspension en milieu hypotonique (cliché 21)-(tampon phosphate de sodium 20 mM, pH 7,4) : toutes les membranes internes gonflent et leur apparence est alors comparable aux membranes internes obtenues par la méthode de Parsons et al. (72).

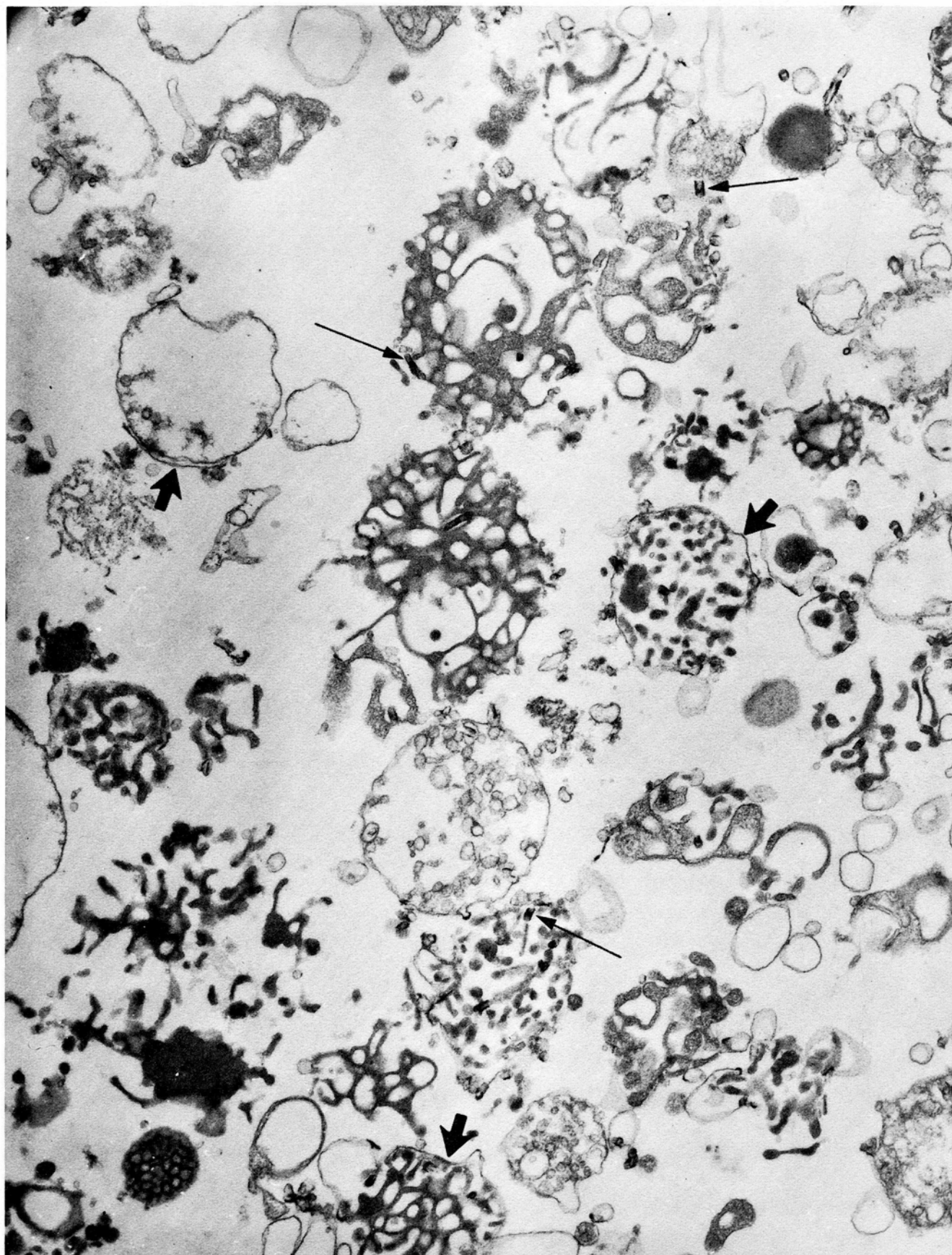


Fig. 19. Attaque des mitochondries de cortex surrénal de boeuf  
par la digitonine

La quantité de digitonine utilisée est de 0,13 mg par mg de protéine. Les mitochondries sont condensées et réorganisées en un lacis tubulaire, la membrane externe est souvent brisée mais reste présente (➡). De nombreuses structures cylindriques opaques aux électrons sont visibles (→). (x 22 500).

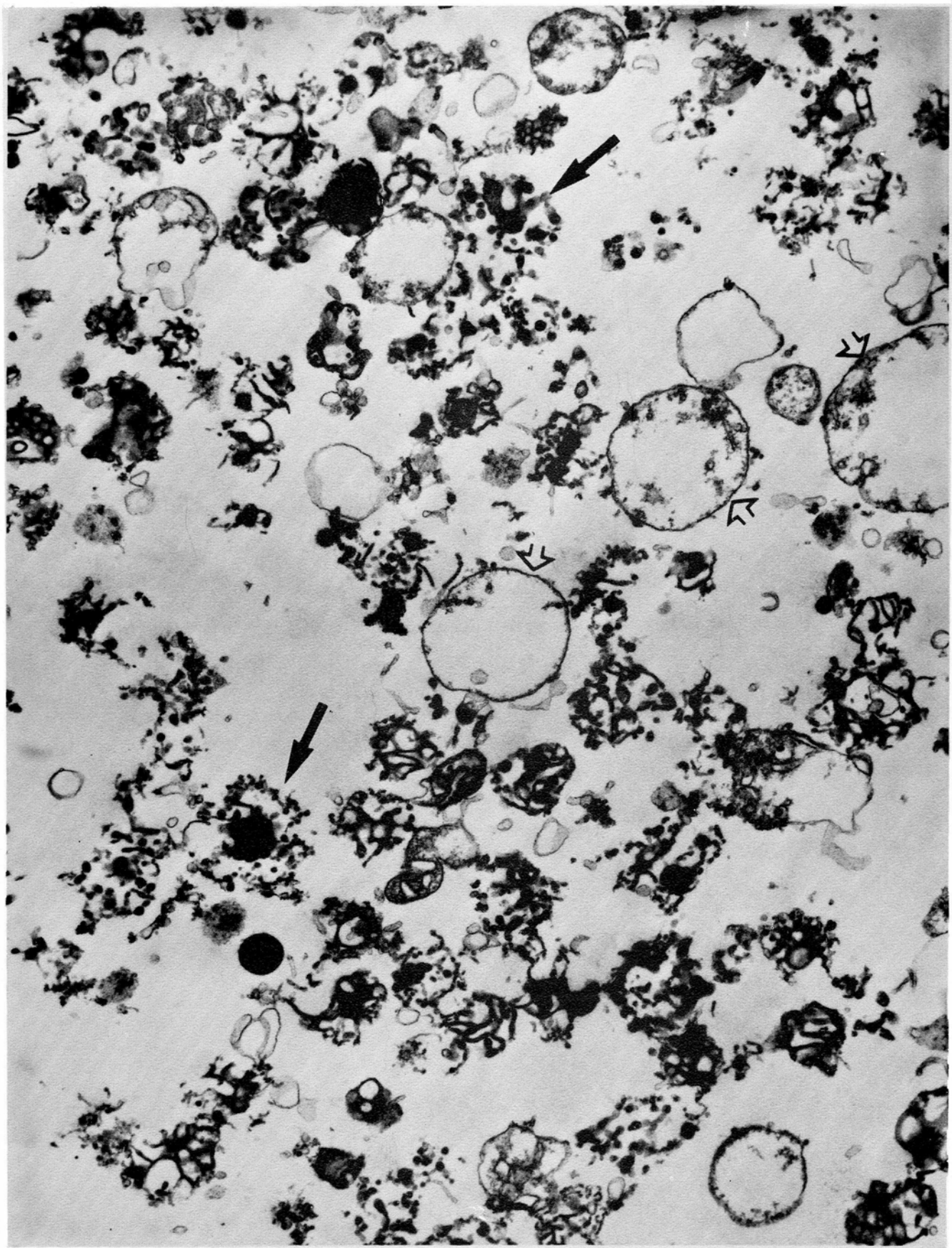


Fig. 20. Coupe mince des membranes internes purifiées  
des mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Une quantité optimale de digitonine : 0,6 mg par mg de protéine est utilisée. Observées en milieu saccharose 0,27 M isotonique, les membranes internes sont très condensées sous une forme tubulaire caractéristique (↑) Certaines membranes sont gonflées. (x 15 600).



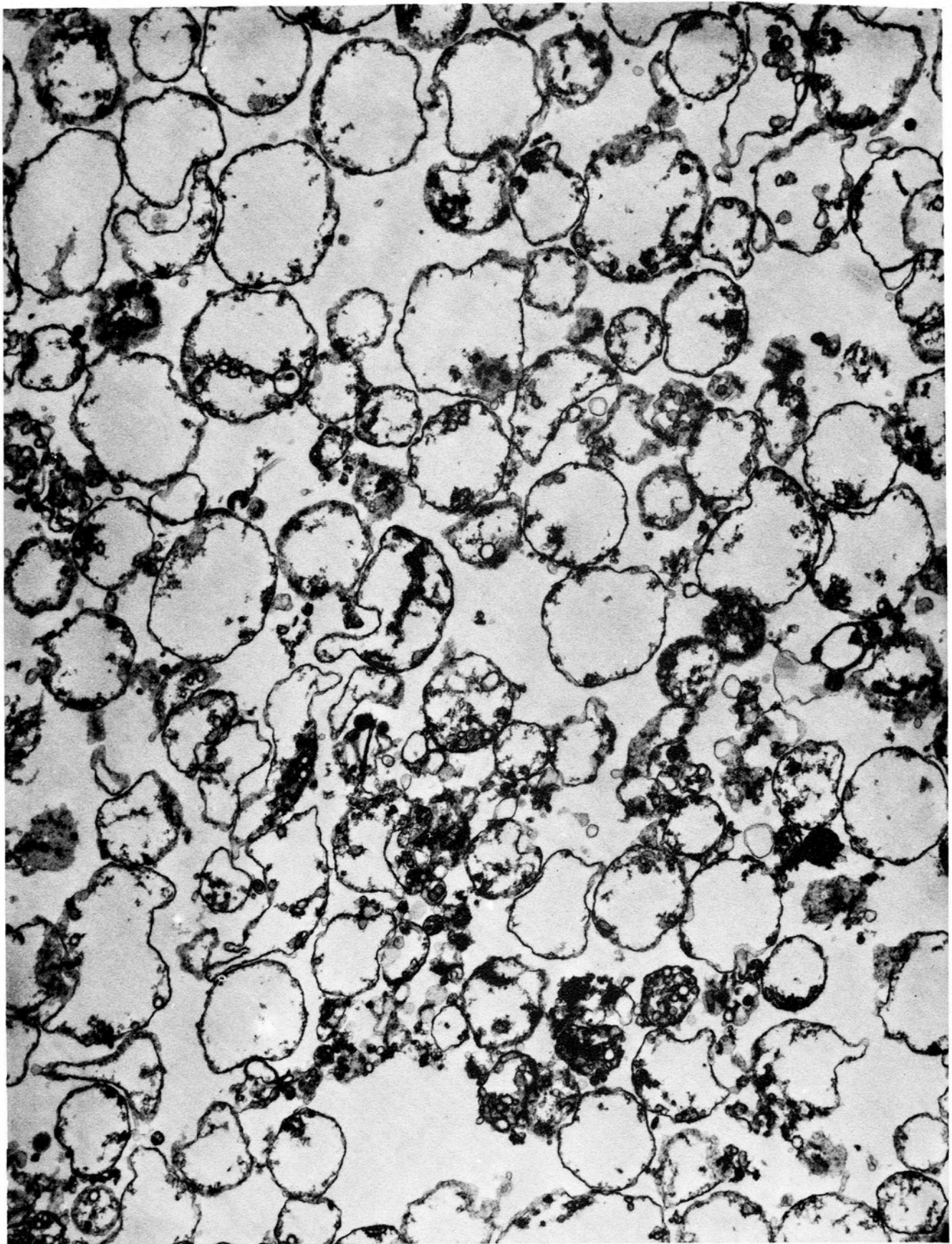


Fig. 21. Coupe mince des membranes internes purifiées  
des mitochondries de cortex surrénal de boeuf. (x 15 600).

La quantité de digitonine utilisée est identique à celle de la fig.2 (0,6 mg par mg de protéine). Observées en milieu hypotonique : tampon phosphate de sodium 20 mM, pH7,4, les membranes internes se présentent comme des vésicules clos limités par une seule membrane, la matrice est diluée. La membrane externe est totalement absente (comparer avec la fig. 14).

Néanmoins la pureté enzymatique correspond à l'absence de contamination visible par la membrane externe mitochondriale.

#### 4.3. Discussion.

Les résultats enzymatiques et morphologiques ci-dessus démontrent qu'un traitement par la digitonine permet d'obtenir des membranes internes très purifiées de mitochondries de cortex surrénal de boeuf. La fraction mitochondriale a un contenu en cholestérol libre plus élevé que celui des mitochondries de foie (104), cela peut expliquer pourquoi la quantité de digitonine requise : 0,6 mg/mg de protéine mitochondriale est environ 3 fois plus importante que pour les mitochondries de foie de rat (80) (81).

Confirmant le résultat déjà obtenu par la méthode de Parsons et al. (72), le cytochrome P-450 reste entièrement associé aux membranes internes mitochondriales purifiées, très appauvries en monoamine oxydase.

## CHAPITRE IV

### INTERACTION DES STEROIDES ET DES INHIBITEURS DE LA 11 $\beta$ -HYDROXYLATION (METYRAPONE, METYRAPOL) AVEC LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

#### INTRODUCTION.

Le cytochrome P-450 est l'oxydase terminale du système de 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes dans le cortex surrénal. De même, les chaînes d'hydroxylation des microsomes de foie (105), de rein (106), du cortex surrénal (107), des microorganismes (108) et autres sources (109) mettent en jeu un cytochrome P-450 pour le métabolisme oxydatif (hydroxylation, déméthylation) d'une grande variété de composés : stéroïdes, acides gras, drogues, ... Le résultat de ces réactions est la transformation du substrat en un produit plus polaire que le composé original.

La première étape de la réaction d'hydroxylation est la fixation réversible de la molécule de substrat sur le cytochrome P-450 (110). Narashimulu et al. (111) ont démontré, les premiers, que l'addition de 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone (substrat du système de 21-hydroxylation des stéroïdes) à une suspension de microsomes de cortex surrénal, produisait un spectre différentiel caractérisé par un pic d'absorption vers 385-390 nm et un minimum d'absorption à 420 nm. Des changements spectraux similaires ont également été observés après addition de désoxycorticostérone ou désoxycortisol (substrats de la 11 $\beta$ -hydroxylase) à des mitochondries de cortex surrénal (112).

Plus généralement, le spectre différentiel de type I (113) correspond à l'interaction spécifique du substrat : stéroïde, acides gras, drogues avec le cytochrome P-450 de son propre système d'hydroxylation : mitochondries et microsomes de cortex surrénal, microsomes de rein et de foie.

Un autre changement spectral, appelé type II (113), est provoqué par des molécules qui ne sont pas des substrats : aniline, octylamine, pyridine, métyrapone, isocyanides, ... Par exemple, l'addition de métyrapone, inhibiteur de la 11 $\beta$ -hydroxylation, à une suspension de mitochondries de cortex surrénal produit un spectre différentiel caractérisé par un maximum d'absorption à 427 nm et un minimum d'absorption à 410 nm.

Des expériences de résonance paramagnétique électronique ont confirmé l'interaction de la désoxycorticostérone et de la métyrapone avec la cytochrome P-450 des mitochondries de cortex surrénal (114)-(117). La désoxycorticostérone provoque le passage du fer du cytochrome P-450 d'un état de bas spin à un état de haut spin. La métyrapone a un effet inverse (114).

Les deux méthodes décrites ci-dessus (changements spectraux et résonance paramagnétique électronique) constituent l'approche la plus fréquente pour mesurer l'affinité des mitochondries de cortex surrénal pour les stéroïdes et les inhibiteurs de la 11 $\beta$ -hydroxylation, tels la désoxycorticostérone et le métyrapol. Dans ce cas, le cytochrome P-450 agit comme une sonde intrinsèque très sensible, indiquant la fixation de divers ligands.

Nous avons utilisé également une approche directe en employant des stéroïdes et inhibiteurs radioactifs ( $^{14}\text{C}$ - et  $^3\text{H}$ -) pour des mesures de fixation sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Dans ce chapitre, les fixations de  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone et  $^3\text{H}$ -métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf seront comparées aux changements spectraux du cytochrome P-450 mitochondrial induits par ces derniers composés.

# A - FIXATION DE DESOXYCORTICOSTERONE SUR LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

## 1. MESURES DIRECTES DE LA FIXATION DE $^{14}\text{C}$ -DESOXYCORTICOSTERONE.

Les mitochondries de cortex surrénal de boeuf fixent la désoxycorticostérone pratiquement instantanément même à 0°C. La fixation a été mesurée pour des concentrations en mitochondries comprises entre 0,7 et 3,6 mg de protéine/ml. Les courbes représentatives tracées selon Scatchard (118), sont montrées sur la fig. 22.

Dans le domaine de concentrations choisi (0,05 à 30  $\mu\text{M}$ ), les courbes expérimentales de fixation présentent une concavité orientée vers le haut. Ceci indique soit :

1) la présence de plusieurs types de sites de fixation (sans interaction), soit :

2) une interaction entre les sites qui, quand le taux d'occupation augmente, diminue l'affinité pour les sites restants. En prenant la première alternative et en supposant seulement deux classes de sites - des sites spécifiques de forte affinité et des sites non-spécifiques de faible affinité -, les paramètres de fixation sont calculés selon l'équation :

$$\frac{B}{F} = \frac{N_1}{K_1 + F} + \frac{N_2}{K_2 + F} \text{ (Eq. 1),}$$

où : B et F sont les concentrations de la  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone liée et libre, respectivement.

$N_1$  et  $K_1$  sont le nombre de sites et la constante de dissociation des sites de forte affinité.



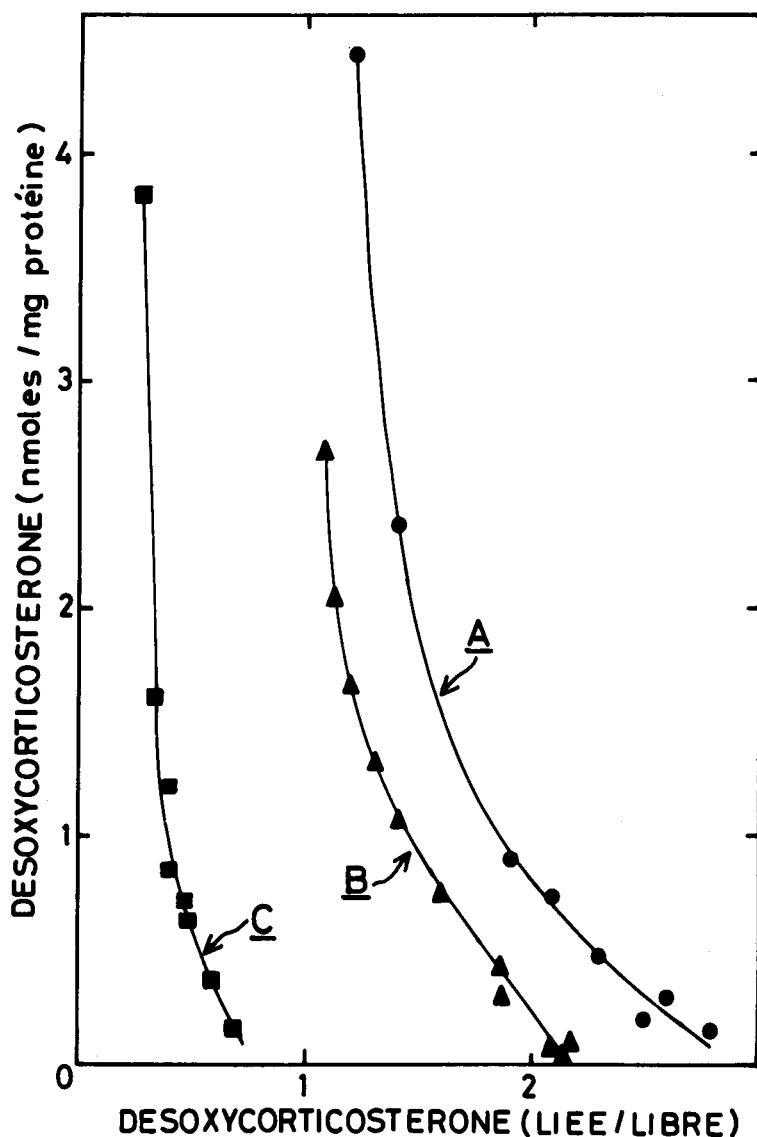


Fig. 22. Fixation de  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Les courbes tracées présentées selon Scatchard (118) correspondent à celles obtenues théoriquement avec les paramètres  $N_1$ ,  $K_1$ ,  $N_2$  et  $K_2$  données ci-dessous avec les conditions expérimentales :

- A -  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone : 0,05 - 30  $\mu\text{M}$  Protéine : 3,7 mg/ml ;  
volume final : 2,0 ml ; pH : 7,2 ; température : 25°C.  $N_1 = 0,75$   
nmole/mg de protéine ;  $K_1 = 1,5 \mu\text{M}$ .  $N_2 = 120$  nmoles/mg de protéine ;  $K_2 = 0,5$  mM.
- B -  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone : 0,1 - 15  $\mu\text{M}$  protéine : 3,3 mg/ml ;  
volume final 2,0 ml ; pH : 7,2 ; température : 25°C.  $N_1 = 0,77$   
nmole/mg de protéine ;  $K_1 = 1,7 \mu\text{M}$ .  $N_2 = 120$  nmoles/mg de protéine ;  $K_2 = 0,5$  mM.
- C -  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone : 0,26 - 18,2  $\mu\text{M}$  protéine : 0,7 mg/ml ;  
volume final : 3,5 ml ; pH : 7,2 ; température 25°C.  $N_1 = 0,74$   
nmole/mg de protéine ;  $K_1 = 1,0 \mu\text{M}$ .  $N_2 = 120$  nmoles/mg<sup>1</sup> de protéine ;  $K_2 = 0,4$  mM.

$N_2$  et  $K_2$  sont le nombre de sites et la constante de dissociation des sites de faible affinité.

Les valeurs suivantes ont été obtenues :

- sites de fixation de forte affinité :

$N_1 = 0,75$  nmole/mg de protéine ;  $K_1 = 1,4$   $\mu$ M.

- sites de fixation de faible affinité :

$N_2 = 120$  nmoles/mg de protéine ;  $K_2 = 0,50$  mM.

La membrane interne mitochondriale contient le cytochrome P-450 et le système de  $11\beta$ -hydroxylation des stéroïdes. En accord avec ces localisations, la  $^{14}$ C-désoxycorticostérone se fixe sur les membranes internes purifiées par la technique à la digitonine de Lévy et al. (79) et Schnaitman et al. (81) adaptée pour les mitochondries de cortex surrénal de boeuf (voir chapitre III). Les paramètres moyens de fixation sont :

- sites de forte affinité :

$N_1 = 0,94$  nmole/mg de protéine ;  $K_1 = 1,4$   $\mu$ M.

- sites de faible affinité :

$N_2 = 100$  nmoles/mg de protéine ;  $K_2 = 0,33$  nM.

## 2. FIXATION DE LA DESOXYCORTICOSTERONE SUR LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF : INTERACTION SPECTRALE.

L'addition de désoxycorticostérone à une suspension de mitochondries de cortex surrénal de boeuf produit un spectre différentiel de type I, (Fig. 23a,b), le maximum et le minimum d'absorption sont à 390 nm et à 420 nm et le point isosbestique est à 407 nm.

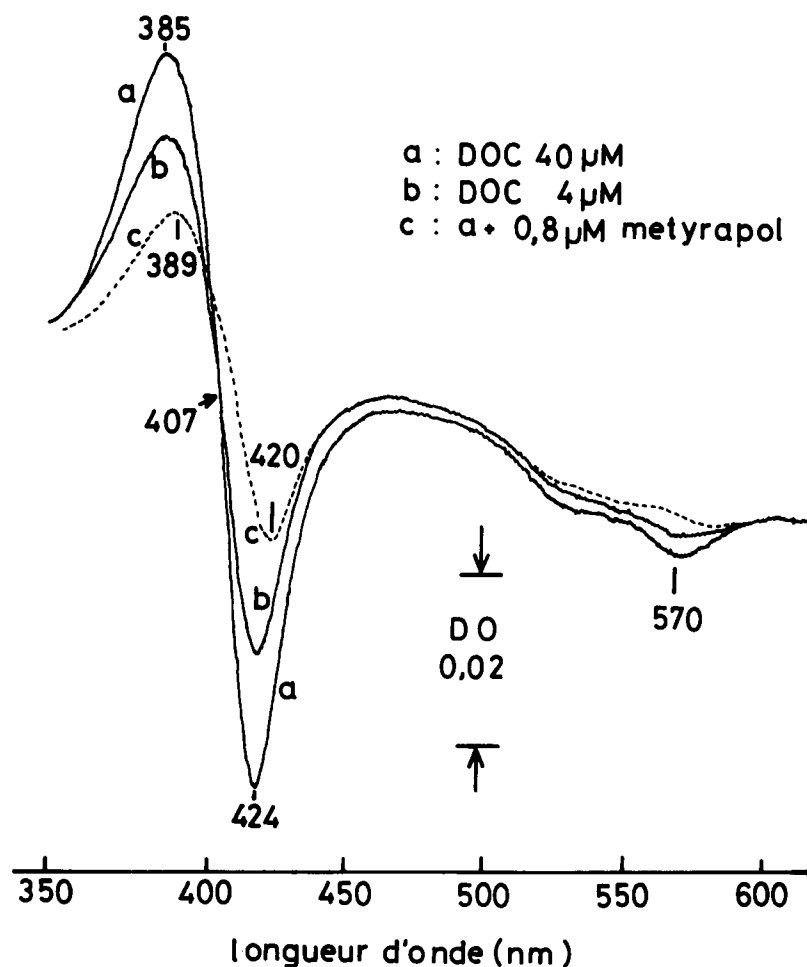


Fig. 23. Spectre différentiel des mitochondries de cortex surrénal de boeuf provoqué par la désoxycorticostérone.  
Effet inhibiteur du métyrapol

Les mitochondries de cortex surrénal de boeuf sont suspendues dans un milieu mixte salin - saccharose (KCl : 50 mM, Saccharose : 0,12 M, HEPES : 5 mM, Phosphate de potassium : 5 mM, pH : 7,2) pour obtenir une concentration finale de 1,7 mg de protéine/ml, et distribuées également dans deux cuvettes de spectrophotomètre. Les spectres différentiels sont enregistrés à 25°C après les additions suivantes : (a) 40  $\mu$ M DOC ; (b) 4  $\mu$ M DOC ; (c) 40  $\mu$ M DOC + 0,8  $\mu$ M métyrapol dans la cuvette test et 0,8  $\mu$ M métyrapol dans la cuvette témoin.

Une courbe de titration a été réalisée par des additions successives de désoxycorticostérone à une suspension mitochondriale à 25°C (Fig. 24). Dans cette expérience, la formation du trou à 420 nm a été suivie et le second monochromateur du spectrophotomètre à double faisceau (Chance-Aminco) a été réglé à 407 nm.

Le changement spectral suit instantanément l'addition du stéroïde, et il se maintient stable, montrant qu'il n'y a plus de donneurs d'électrons endogènes capables d'hydroxyler la désoxycorticostérone en corticostérone. Une constante apparente de dissociation ( $K_A$ ) est calculée en traçant l'inverse de la densité optique  $D_{420-407 \text{ nm}}$  en fonction de l'inverse de la concentration en désoxycorticostérone (113) : dans les conditions de la fig. 24, pour une concentration en protéine de 0,32 mg/ml, on trouve  $K_A = 1,2 \text{ } \mu\text{M}$ . L'amplitude du changement spectral maximal est  $\Delta_{D0} 420-407 \text{ nm} = 0,025$ .

L'amplitude maximale du changement spectral est normalement proportionnelle à la concentration en protéine. Par contre la constante spectrale de dissociation varie avec la quantité de protéine. Les résultats d'une expérience où le changement spectral total (pic-trou) :  $\Delta_{D0} 420-385 \text{ nm}$  a été titré est montré sur le tableau ci-dessous :

Paramètres quantitatifs du changement spectral induit  
par la désoxycorticostérone en fonction de la  
concentration en protéine

Protéine mg/ml	$\Delta_{D0} \text{ max}$	$K_S (\mu\text{M})$
0,30	0,0524	1,9
0,76	0,0375	2,1
1,50	0,0485	2,9
2,30	0,0387	3,5
3,00	0,0470	4,1

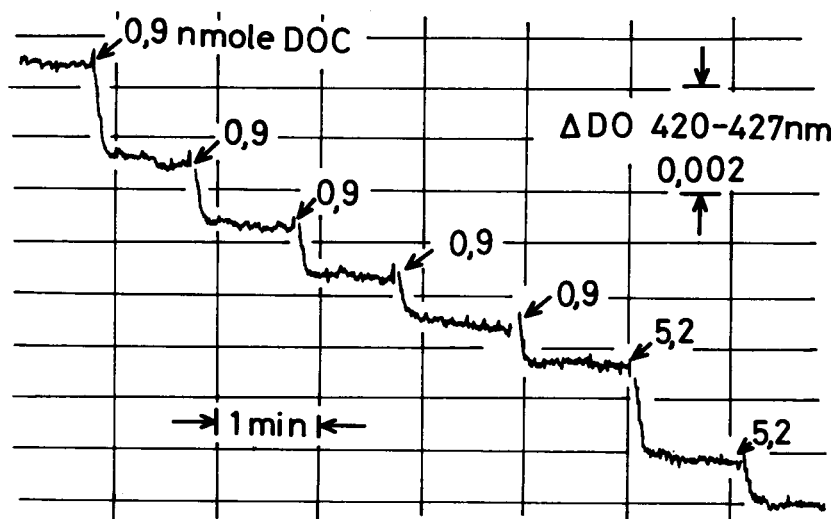


Fig. 24. Titration spectrale des mitochondries de cortex surrénal de boeuf par la désoxycorticostérone

Dans le milieu précédent (fig. 23) la concentration en protéines mitochondriales est 0,32 mg/ml (volume final : 3,5 ml, température : 25°C). Les deux monochromateurs du spectrophotomètre Chance-Aminco sont réglés à 420 et 407 nm. Des additions successives de désoxycorticostérone sont réalisées comme indiqué.

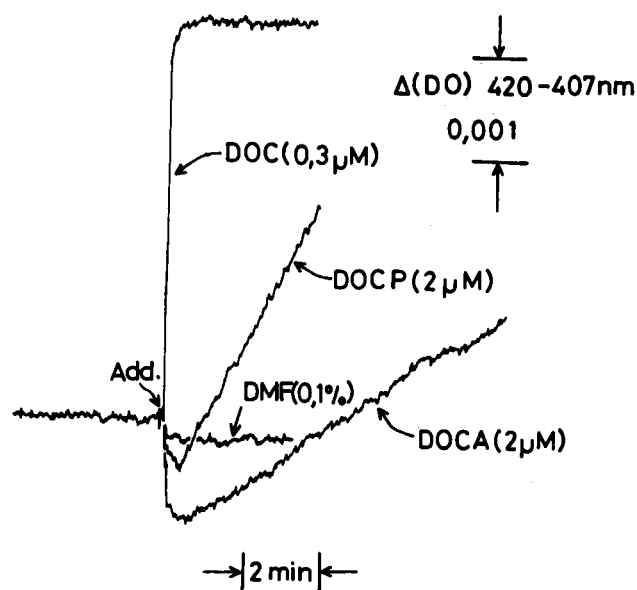


Fig. 25. Interaction spectrale de la désoxycorticostérone et de l'acétate et propionate de désoxycorticostérone avec les mitochondries de cortex surrénal.

Les mitochondries de cortex surrénal sont diluées dans 3 ml de milieu salin à 25°C, pH 7,2. La concentration en protéines est 1,2 mg/ml. Les deux monochromateurs du spectrophotomètre Chance-Aminco sont réglés à 420 et 407 nm. Les effets de l'addition (add.) de désoxycorticostérone (DOC) : 0,3 μM ; d'acétate de désoxycorticostérone (DOCA) : 2 μM ; de propionate de désoxycorticostérone (DOCP) : 2 μM. et de diméthyl formamide (DMF) : 0,1 % (concentration introduite avec les stéroïdes) sont représentés.

$\Delta_{DO}$  max : amplitude maximale du changement spectral (420-385 nm) ramenée à une concentration en protéine de 1 mg/ml, a une valeur moyenne de 0,047. La constante spectrale de dissociation ( $K_S$ ) extrapolée pour une concentration nulle en protéine est 1,6  $\mu$ M ; cette valeur est similaire à la constante de dissociation des sites de forte affinité ( $K_1 = 1,4 \mu$ M), mesurée directement avec la  $^{14}$ C-désoxycorticostérone.

La variation de la constante spectrale de dissociation avec la quantité de protéine utilisée avait déjà été décrite par Whysner et al. (115) pour l'interaction de la désoxycorticostérone avec les mitochondries de cortex surrénal. Elle avait également été observée par Cooper et al. (119) lors de la titration spectrale des microsomes de cortex surrénal par la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone. Cette dépendance est sans doute explicable par la présence d'une fixation non-spécifique importante et par l'utilisation dans l'exploitation graphique de la concentration totale en désoxycorticostérone au lieu de la concentration libre. Ce dernier point sera discuté plus loin avec plus de détails lors de l'interaction spectrale du métyrapol avec les mitochondries de cortex surrénal.

L'interaction spectrale de type I avec les mitochondries de cortex surrénal, décrite pour la désoxycorticostérone, est spécifique des stéroïdes substrats de la 11 $\beta$ -hydroxylation comme le désoxycortisol ou l'androstènedione, par exemple (116). La corticostérone, la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone ne fournissent pas de spectre de type I.

L'hydroxyle en position 21 de la désoxycorticostérone peut être converti en acétate ou propionate. Les interactions spectrales obtenues sont montrées sur la fig. 25. L'addition des acétate ou propionate provoque d'abord une variation de densité optique de sens opposé à celle obtenue avec la désoxycorticostérone. L'intégrité de l'hydroxyle en 21, nécessaire pour la réaction enzymatique de 11 $\beta$ -hydroxylation (120), l'est également pour l'interaction spectrale.

Une lente réaction se développe ensuite dans le sens correspondant au spectre de type I : les esters de désoxycorticostérone sont vraisemblablement hydrolysés (120) et refournissent progressivement le stéroïde libre. Nous n'avons pas étudié si cette activité hydrolytique était réellement mitochondriale ou si elle était due à une contamination par des éléments extramitochondriaux.

### 3. FIXATION DE DESOXYCORTICOSTERONE SUR LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF : EFFET INHIBITEUR DE LA METYRAPONE ET DU METYRAPOL.

#### 3.1. Mesures directes de fixation de $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone.

La métyrapone et le métyrapol sont des inhibiteurs compétitifs de la  $11\beta$ -hydroxylation de la désoxycorticostérone, suggérant la possibilité d'un site commun de fixation avec le stéroïde (121)-(123). La figure 26 montre que de faibles concentrations de métyrapone diminuent la fixation de désoxycorticostérone sur les membranes internes purifiées des mitochondries de cortex surrénal. Les courbes expérimentales ont été décomposées en supposant seulement la présence de deux classes de sites : sites de forte et faible affinité. Lorsque la concentration en métyrapone croît, le nombre de sites de fixation de forte affinité ( $N_1$ ) diminue sans changement significatif de la constante de dissociation  $K_1$  ; d'autre part, les sites de fixation non-spécifiques ne sont pas affectés ni en nombre ( $N_2$ ) ni en affinité ( $K_2$ ) (Tableau 6). La métyrapone se comporte donc paradoxalement comme un inhibiteur non-compétitif de la fixation de la désoxycorticostérone. On montre dans le paragraphe suivant : cas particulier C, que ce phénomène est provoqué par la forte affinité de la métyrapone pour les mitochondries de cortex surrénal de boeuf. Aux faibles concentrations en désoxycorticostérone, la courbe de Scatchard est inversée, c'est-à-dire que le rapport (lié/libre) augmente quand la quantité de stéroïde lié augmente.

TABLEAU 6

Effet de la métyrapone  
sur la fixation de la  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone  
sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Métyrapone ( $\mu\text{M}$ )	$N_1$	$K_1$ ( $\mu\text{M}$ )	$N_2$	$K_2$ (mM)
0,0	1,15	1,48	150	0,55
0,125	0,95	1,47	150	0,55
0,25	0,73	1,47	150	0,55
2,5	0,22	1,48	150	0,58
12,5	0,15	1,47	150	0,58

$N_1$  et  $N_2$  sont les nombres de sites de fixation de la désoxycorticostérone de forte et faible affinité respectivement (en nmoles/mg de protéine).

$K_1$  ( $\mu\text{M}$ ) et  $K_2$  (mM) sont les constantes de dissociation respectives des sites de forte et de faible affinité.



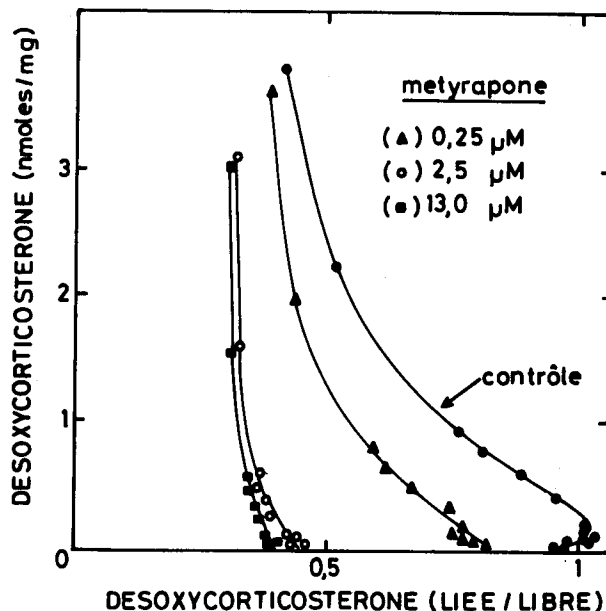


Fig. 26. Effet inhibiteur de la metyrapone sur la fixation de  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone sur les membranes internes purifiées des mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Les tubes d'incubation contiennent dans un volume final de 2 ml de milieu salin, à 25°C, pH 7,2, une concentration variable de  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone : 0,02 - 14  $\mu\text{M}$ . La réaction est initiée par addition des membranes internes purifiées par la méthode à la digitonine (2,3 mg de protéine). En plus du contrôle sont représentées les courbes en présence de metyrapone : 0,25 - 2,5 et 13  $\mu\text{M}$ . Les paramètres quantitatifs correspondants sont donnés dans le tableau 6.

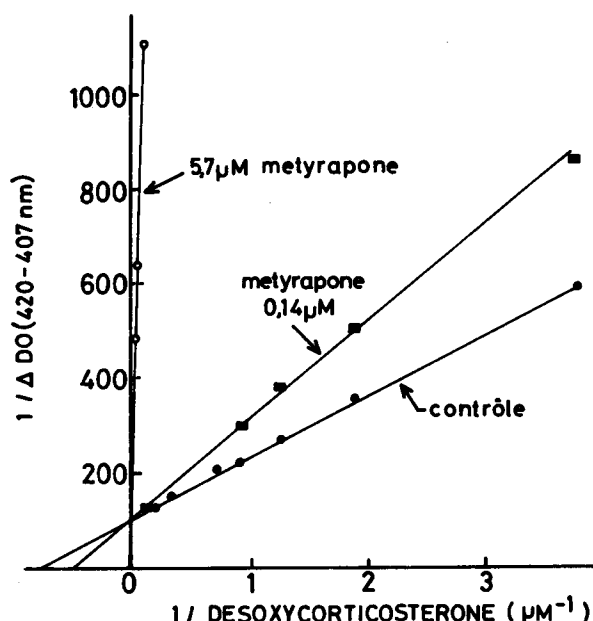


Fig. 27. Interaction spectrale de la désoxycorticostérone avec les mitochondries de cortex surrénal de boeuf : inhibition par la metyrapone.

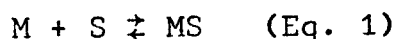
La concentration en protéine est 0,32 mg/ml, le volume final 3,5 ml et la température : 25°C. La droite contrôle correspond aux données de la Fig. 24. Par régression linéaire les valeurs suivantes sont obtenues :  $K_s = 1,2 \mu\text{M}$  et  $\Delta\text{OD max} = 0,0096$ . En présence de metyrapone : 0,14 et 5,7  $\mu\text{M}$ ,  $\Delta\text{OD max}$  devient respectivement 0,0086 et 0,0080. Si en première approximation l'inhibition est considérée de type compétitif, les  $K_i$  correspondants sont 0,35 et 0,13  $\mu\text{M}$ .

Ces courbes peuvent être expliquées par des effets coopératifs, mais dans notre cas, il est beaucoup plus vraisemblable qu'une fraction de la désoxycorticostérone a été hydroxylée en corticostérone grâce aux substrats endogènes résiduels : anions du cycle de Krebs ou même acides gras. Des résultats d'inhibition analogues ont été obtenus avec le métyrapol.

### 3.2. Equation générale de l'équilibre de fixation d'un ligand en présence d'un inhibiteur compétitif.

Lorsque les inhibiteurs compétitifs ont une affinité élevée les formules habituelles (124) ne sont plus applicables ; divers auteurs (125) (126) ont souligné la nécessité d'utiliser une formule générale donnant la fixation du ligand (S) en présence de l'inhibiteur compétitif (I).

Soit les deux équilibres :



M, S, I, (MS), (MI) sont les concentrations respectives :

- des sites de fixation vides : M
- du ligand libre : S
- de l'inhibiteur libre : I
- un ligand lié : (MS)
- de l'inhibiteur lié (MI).

K et  $K_i$  étant les constantes de dissociation respectives, la loi d'action de masse donne :

$$K = \frac{(M)(S)}{(MS)} \quad (\text{Eq. 3}) \quad \text{et} \quad K_i = \frac{(M)(I)}{(MI)} \quad (\text{Eq. 4})$$

$I_t$  et N étant les concentrations totales de l'inhibiteur et des sites de fixation, nous avons :

$$I_t = I + (MI) \quad (\text{Eq. 5})$$

$$N = M + (MS) + (MI) \quad (\text{Eq. 6}).$$

Les équations 4,5 nous donnent :

$$I_t = I + \frac{(M)(I)}{K_i}$$

$$\text{Soit } I = \frac{I_t}{1+M/K_i} = \frac{I_t}{1 + \frac{(MS)}{S} \times \frac{K}{K_i}} \quad (\text{Eq. 7}).$$

Les équations 4,6 donnent :

$$N - (MS) = M + \frac{(M)(I)}{K_i} = M \left( 1 + \frac{I}{K_i} \right)$$

Soit en utilisant l'équation 7 :

$$M = \frac{N - (MS)}{1 + \frac{I_t}{K_i + \frac{MS}{S} \times K}}$$

En remplaçant M par cette dernière valeur dans l'équation 3 nous avons la relation :

$$\frac{(MS)}{S} \left( 1 + \frac{I_t}{K_i + K \frac{(MS)}{S}} \right) = \frac{1}{K} \left( N - (MS) \right) \quad (\text{Eq. 8})$$

#### Cas particuliers.

A -  $\frac{I_t}{S} = 0$  équation de Scatchard (118) pour un type de sites

$$\frac{(MS)}{S} = \frac{1}{K} \left( N - (MS) \right) \quad (\text{Eq. 9}).$$

- équation d'une droite de pente (- K) et d'ordonnée à l'origine (N).

B - Ligand de forte affinité ( $K \simeq 10^{-8}$  M) et inhibiteur de faible affinité ( $K_i \simeq 10^{-6}$  M) :

$K \frac{(MS)}{S}$  est négligeable devant  $K_i$

$$\text{et } \frac{(MS)}{S} = \frac{1}{K \left(1 + \frac{I_t}{K_i}\right)} \left[N - (MS)\right] \quad (\text{Eq. 10})$$

- équation d'une droite ayant la même ordonnée à l'origine que le contrôle (N) mais dont la pente est modifiée ( $-K(1+I_t/K_i)$ ) ; l'inhibition apparaît compétitive et  $K_i$  peut être calculé.

C - Ligand de faible affinité ( $K \simeq 10^{-6}$  M) et inhibiteur de forte affinité ( $K_i \simeq 10^{-8}$  M) :

$K_i$  est négligeable devant  $K \frac{(MS)}{S}$

$$\text{d'où : } \frac{(MS)}{S} = -\frac{(MS)}{K} + \frac{(N - I_t)}{K} \quad (\text{Eq. 11}).$$

- équation d'une droite ayant la même pente ( $-K$ ) que le contrôle mais ayant une ordonnée à l'origine différente ( $N - I_t$ ). Dans ce cas, le calcul de  $K_i$  n'est plus possible car comme cela a été signalé par Webb (125) l'inhibition est indépendante du  $K_i$ . L'inhibition semble paradoxalement non-compétitive (126).

### 3.3. Interaction spectrale de la désoxycorticostérone : inhibition par la métyrapone et le métyrapol.

La métyrapone et le métyrapol diminuent l'amplitude du changement spectral produit par la désoxycorticostérone. Le changement spectral de type I produit par l'interaction de la désoxycorticostérone avec les mitochondries de cortex surrénal a été discuté précédemment (112) (115). Si du métyrapol (ou de la métyrapone) est ajouté à la suspension mitochondriale avant de répartir entre les deux cuvettes du spectrophotomètre, le spectre différentiel obtenu par addition de 40  $\mu$ M de désoxycorticostérone dans la cuvette test (fig. 23C) est très diminué par rapport au contrôle ; en effet le métyrapol empêche une fixation complète de la désoxycorticostérone sur les sites responsables de l'interaction spectrale.

En fait, à cause de l'effet spectral de type II propre au métyrapol, le spectre (C) est plus complexe qu'une diminution pure du spectre de type I induit par la désoxycorticostérone : ceci est apparent par le léger décalage des positions du maximum et minimum d'absorption vers les longueurs d'onde plus élevées.

Une expérience de titration spectrale par la désoxycorticostérone a été réalisée en présence de deux concentrations très différentes de métyrapone (0,14 et 5,7  $\mu\text{M}$ ). Les tracés de l'inverse de la densité optique  $\Delta\text{D}_{420-407}$  nm en fonction de l'inverse de la concentration totale en désoxycorticostérone montrent que la métyrapone se comporte ici comme un inhibiteur compétitif de l'interaction spectrale de la désoxycorticostérone ; la constante spectrale d'inhibition  $K_i$  calculée à partir des résultats de la fig. 27 est 0,24  $\mu\text{M}$ , similaire aux valeurs publiées pour l'inhibition de la  $11\beta$ -hydroxylation 0,21  $\mu\text{M}$  (57) et 0,1  $\mu\text{M}$  (122).

### 3.4. Mesure de la désoxycorticostérone et de la corticostérone intramitochondriale.

Pour déterminer si l'interaction de la désoxycorticostérone avec les mitochondries de cortex surrénal, échange de la désoxycorticostérone externe contre la corticostérone intramitochondriale, il convenait de doser les stéroïdes endogènes.

Les mitochondries (50-100 mg de protéine) sont extraites par 3 fois 50 ml d'acétate d'éthyle, après addition de traceurs radio-actifs :  $^3\text{H}$  - DOC et  $^3\text{H}$ -corticostérone (environ 100 000 dpm de chaque stéroïde). L'extrait séché sur sulfate de sodium, est évaporé à sec. La désoxycorticostérone et la corticostérone sont séparées sur une colonne d'acide silicique (Merck, 100 - 120 Mesh ; 5 g). Après le passage de 50 ml de chloroforme - hexane (CH) (9 : 1) qui éluent le cholestérol, la prégnénolone et la progestérone, la désoxycorticostérone est éluee par 30 ml de (CH + Ethanol 1%).



#### 4. DISCUSSION.

Les résultats exposés ci-dessus mettent directement en évidence la fixation de désoxycorticostérone sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf. Les données de fixation sont explicables par un modèle à deux types de sites : un nombre limité de sites spécifiques de forte affinité et un grand nombre de sites non-spécifiques. L'analyse des résultats a été faite en fonction de ce modèle. Il faut néanmoins souligner que la grande différence d'ordre de grandeur des nombres des sites de forte et faible affinité (environ 100) ne permet pas une détermination précise des paramètres.

Les caractéristiques des sites de fixation de forte affinité sont comparables à l'interaction spectrale de la désoxycorticostérone avec le cytochrome P-450 mitochondrial, en particulier la constante spectrale de dissociation ( $K_s$ ) est similaire à la constante de dissociation des sites spécifiques ( $K_1$ ). Le nombre de sites spécifiques ( $N_1$ ) est du même ordre de grandeur que le contenu en cytochrome P-450, mais, en général plus faible (environ 50 %). Ce fait suggère qu'une partie du cytochrome P-450 ne réagit pas avec la désoxycorticostérone. Les mitochondries de cortex surrénal contiennent deux systèmes distincts d'hydroxylation associés au cytochrome P-450 : le clivage de la chaîne latérale du cholestérol et la 11 $\beta$ -hydroxylation. Il est vraisemblable que la désoxycorticostérone ne réagit qu'avec le cytochrome P-450 spécifique de la 11 $\beta$ -hydroxylation. Ce problème sera discuté à nouveau à propos de la fixation du métyrapol tritié.

La bonne corrélation entre les données spectrales et les mesures directes avec la  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone, suggère que nous mesurons bien une fixation nette et non pas un échange avec des stéroïdes endogènes.

Les caractéristiques de fixation des sites de faible affinité sont très nettement différentes de ce qui vient d'être décrit. Le nombre de sites de fixation ( $N_2$ ) est très largement excédentaire par rapport au contenu en cytochrome P-450, il devient, par contre, du même ordre de grandeur que la teneur en phospholipides des mitochondries (400 nmoles/mg de protéine). La constante de dissociation ( $K_2$ ) est similaire aux valeurs publiées pour la fixation non-spécifique des stéroïdes sur l'albumine (127).

L'ensemble des molécules de désoxycorticostérone associé à la membrane interne mitochondriale du cortex surrénal se distribuerait entre deux types de sites en équilibre avec la désoxycorticostérone libre dans le milieu extramitochondrial :

- des sites spécifiques fonctionnels associés au cytochrome P-450,
- des sites non spécifiques associés à des régions hydrophobes de la membrane (lipides et protéines). En fait, ces sites peuvent être interprétés comme une partition du stéroïde entre le milieu d'incubation : phase aqueuse, et la membrane : phase hydrophobe.

La métyrapone (et le métyrapol), inhibiteurs de la 11 $\beta$ -hydroxylation (121)-(123) diminuent spécifiquement la fixation de la  $^{14}\text{C}$ -désoxycorticostérone sur les sites de forte affinité. L'inhibition de la fixation semble de nature non-compétitive. L'utilisation de la formule générale de fixation d'un ligand en présence d'un inhibiteur compétitif a montré que cet effet est provoqué par la forte affinité de la métyrapone (ou du métyrapol) pour les mitochondries de cortex surrénal. De tels comportements paradoxaux ont été décrits pour l'inhibition enzymatique (125) (126).



La métyrapone (et le métyrapol) inhibent également l'interaction spectrale de la désoxycorticostérone ; la constante d'inhibition déduite de ces expériences ( $K_i = 0,24 \mu\text{M}$ ) est similaire à la valeur de la constante d'inhibition de la réaction de  $11\beta$ hydroxylation.

B - INTERACTION DE LA METYRAPONE ET DU METYRAPOL AVEC LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

La métyrapone (2-méthyl-1,2 bis(3-pyridyl)-1-propanone) est un composé très étudié comme inhibiteur compétitif de la  $11\beta$ -hydroxylation des stéroïdes dans le cortex surrénal et utilisé comme tel dans un test clinique du fonctionnement de l'axe hypophyse-cortex surrénal (128).

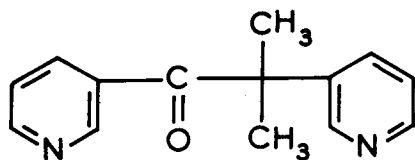
Contrairement aux hypothèses de divers auteurs, la métyrapone n'est pas un analogue de stéroïde (121), mais bien que structuralement différente, elle agit sans doute au niveau d'un site identique ou très voisin de celui des stéroïdes substrats de la  $11\beta$ -hydroxylation (122) (129) (130). C'est dans cette optique que nous avons décrit précédemment l'effet inhibiteur de la métyrapone sur l'interaction de la désoxycorticostérone avec les mitochondries de cortex surrénal. D'autre part, les expériences réciproques étudiant l'interaction de la métyrapone (ou pour des raisons techniques plutôt son produit de réduction, le métyrapol) avec les mitochondries de cortex surrénal de boeuf, sont décrites ci-après.

Nous montrerons tout d'abord que la métyrapone et le métyrapol (Fig. 28) ont des propriétés inhibitrices identiques vis-à-vis de la 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes. Les caractéristiques de l'interaction spectrale du métyrapol avec le cytochrome P-450 des mitochondries de cortex surrénal seront décrites et comparées aux mesures directes de fixation du métyrapol tritié.

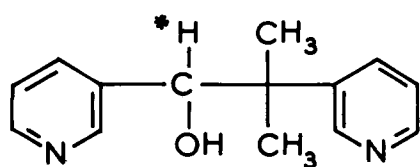
A l'origine, la métyrapone était considérée comme un inhibiteur spécifique de la 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes : en effet, dans le cortex surrénal, le clivage de la chaîne latérale du cholestérol (localisé dans les mitochondries) et le système de 21-hydroxylation des stéroïdes (localisé dans les microsomes) sont insensibles à l'inhibition par la métyrapone (121) (132). A ce jour, la métyrapone semble être un réactif plus général du cytochrome P-450. Dans le cortex surrénal, la métyrapone inhibe également les systèmes de 18- et 19-hydroxylation des stéroïdes (132) (133). De plus, la métyrapone est un bon inhibiteur de diverses réactions d'hydroxylation de drogues dans les microsomes de foie de rat (129) et chez la bactérie *Pseudomonas putida* (130).

# 1. PROPRIETES INHIBITRICES DU METYRAPOL SUR LA 11 $\beta$ -HYDROXYLATION DES STEROIDES : COMPARAISON AVEC LA METYRAPONE.

Le tracé polarographique (fig. 29) illustre la stimulation caractéristique, par la désoxycorticostérone, de la respiration insensible au cyanure des mitochondries de cortex surrénal ; le malate est le substrat utilisé. Cette réaction est due à la 11 $\beta$ -hydroxylation de la désoxycorticostérone en corticostérone qui nécessite de l'oxygène moléculaire. Tout comme la métyrapone (64), le métyrapol inhibe la stimulation de la vitesse de consommation de l'oxygène d'une manière compétitive : l'inhibition est levée par une augmentation de la concentration de la désoxycorticostérone de 40 à 600  $\mu$ M.



METYRAPONE



METYRAPOL

Fig. 28. Formules chimiques de la metyrapone et du metyrapol.

La localisation de l'atome tritié dans le metyrapol est indiquée par un astérisque.

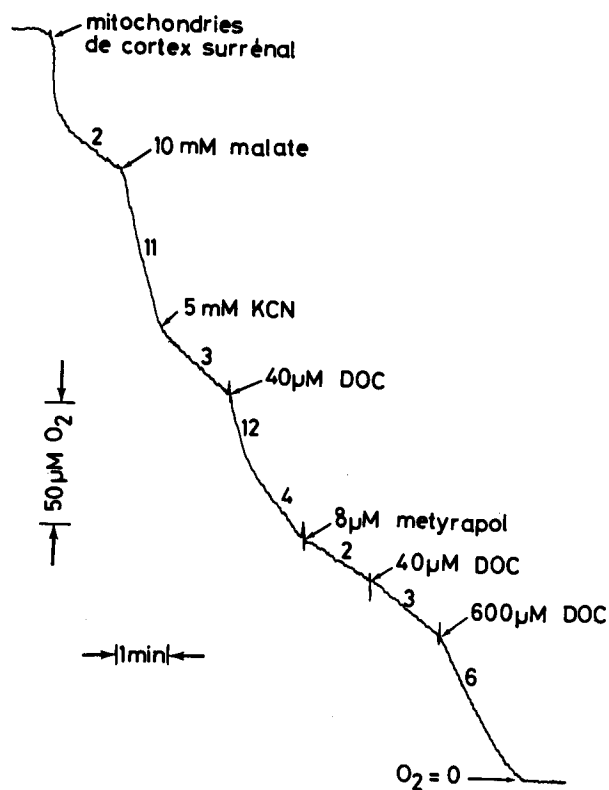


Fig. 29

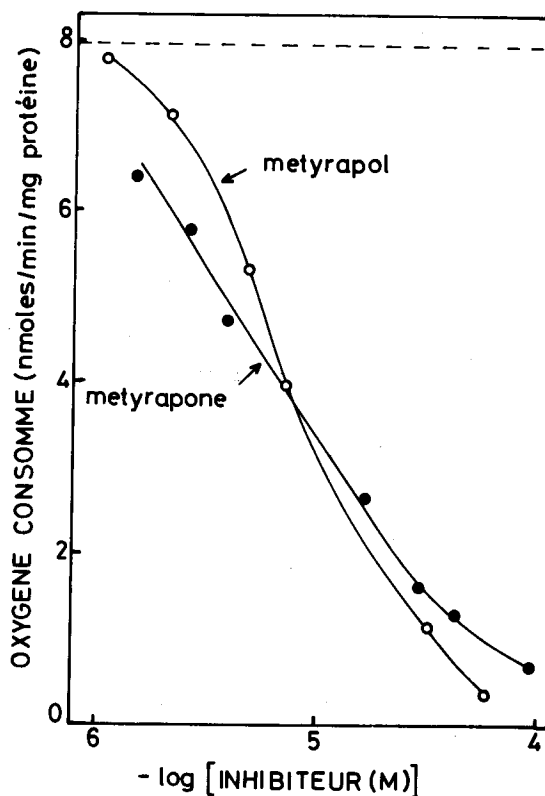


Fig. 30

Fig. 29. Inhibition par le metyrapol de la consommation d'oxygène par les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Les mitochondries (5,7 mg) sont ajoutées à 1,9 ml de milieu salin à 25° contenant 0,12 M KCl, 20 mM HEPES, 10 mM phosphate de potassium, pH 7,2. Les additions de L-malate, cyanure, désoxycorticostérone et metyrapol sont faites comme indiqué. Les chiffres le long du tracé sont les vitesses de consommation d'oxygène en nmoles/min/mg de protéine.

Fig. 30. Inhibition par la metyrapone et le metyrapol de la consommation d'oxygène stimulée par la désoxycorticostérone.

Les mitochondries (6,2 mg) sont ajoutées à 2 ml de milieu salin à 25° pH 7,2, contenant du L-malate : 10 mM, de l'Antimycine A : 25 μg, de la désoxycorticostérone (0,6mM), et des concentrations croissantes de metyrapone et metyrapol. Le trait pointillé est la consommation en l'absence d'inhibiteurs.

Des courbes de titration déterminées par cette méthode polarographique sont montrées sur la fig. 30. Il apparaît que la métyrapone et le métyrapol ont des capacités inhibitrices analogues vis-à-vis de la 11 $\beta$ -hydroxylation de la désoxycorticostérone. La fonction cétone n'est donc pas primordiale pour l'inhibition, ce qui permet l'utilisation du métyrapol tritié de haute activité spécifique pour l'étude de l'interaction avec les mitochondries de cortex surrénal.

Métyrapone et métyrapol sont des inhibiteurs compétitifs très actifs de la 11 $\beta$ -hydroxylation : ils ont au moins 60 fois plus d'affinité que le substrat. En effet des concentrations 10  $\mu$ M de ces inhibiteurs sont suffisantes pour inhiber de 50 % la consommation d'oxygène associée à l'hydroxylation de 600  $\mu$ M de désoxycorticostérone.

## 2. CINETIQUE DE FIXATION DU METYRAPOL SUR LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

La fixation du métyrapol sur les mitochondries isolées du cortex surrénal de boeuf est une réaction rapide (fig. 31) ; même à 0°C l'équilibre de fixation est presque atteint en une à deux minutes. L'affinité du métyrapol pour les mitochondries est légèrement plus faible à 30°C qu'à 0°C, comme le montre la quantité fixée à l'équilibre sensiblement réduite à 30°C. Le métyrapol radioactif fixé peut être relâché par addition d'un large excès de métyrapol non-marqué. Dans ces conditions, le métyrapol non-marqué occupe tous les sites de fixation restés éventuellement vacants et chaque molécule de métyrapol tritié qui se dissocie n'est remplacée pratiquement que par des molécules non-radioactives. Le relâchement du métyrapol lié est plus lent que la fixation et l'effet de la température est démontré sur la fig. 31. Le temps de demi-dissociation est environ 5 minutes à 0°C et moins de 30 secondes à 30°C.

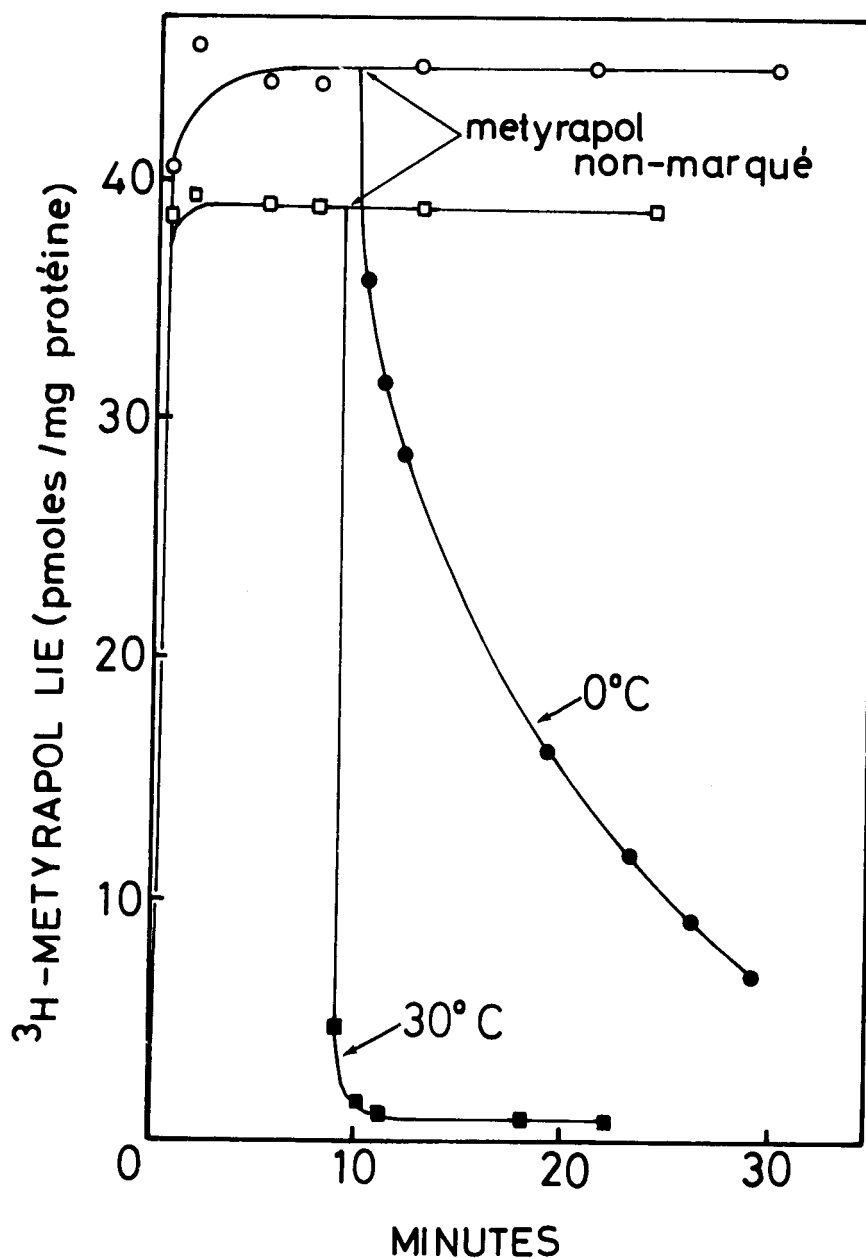


Fig. 31. Cinétique de fixation du  $^3\text{H}$ -metyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Les mitochondries (12 mg) sont ajoutées au temps zéro dans 15 ml de milieu salin à 0°C contenant  $4,1 \times 10^{-8}$  M  $^3\text{H}$ -metyrapol. Le metyrapol non-marqué (concentration finale :  $4 \times 10^{-5}$  M) est ajouté à une fraction de 8 ml. Aux temps indiqués, des échantillons de 1 ml sont prélevés et immédiatement filtrés sur Millipore (taille des pores :  $0,45 \mu$ , diamètre : 25 mm). Les mitochondries sont rapidement lavées par 5 ml de milieu salin à 0°C.

Une expérience identique est faite à 30°C.

Signalons, dès maintenant, que la capacité de fixation des mitochondries de cortex surrénal est complètement détruite par chauffage à 100°C pendant une minute (une étude plus détaillée de l'inactivation thermique sera présentée plus loin).

## 2.1. Etude quantitative de la cinétique d'association du métyrapol avec les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Des filtrations rapides sur filtres Millipore ont permis des mesures précises de la fixation du métyrapol sur les mitochondries, à 0°C. Les supports des filtres sont adaptés à des seringues et, aux temps indiqués, le contenu du tube d'incubation est transféré dans le corps de la seringue et immédiatement filtré. La radioactivité d'une partie aliquote du filtrat est mesurée et permet de déduire la quantité de métyrapol tritié fixée. (fig. 32). La constante cinétique d'association  $k_1$  est calculée en supposant une réaction du second-ordre :

métyrapol libre + sites vacants  $\xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1}$  sites occupés (ou métyrapol lié).

Si  $a$  est la concentration totale des sites de fixation,  $b$  la concentration du métyrapol total, et  $x$  la concentration du ligand lié (ou des sites occupés) au temps  $t$ , nous avons la relation suivante :

$$t = \frac{2,3}{k_1(b-a)} \log \frac{b-x}{a-x} + \frac{2,3}{k_1(b-a)} \log \frac{a}{b}$$

Les expressions  $(b-x)$  et  $(a-x)$  représentent les concentrations du métyrapol libre et des sites libres, respectivement. La relation montre que pour des temps assez courts, le tracé du temps  $t$  en fonction du logarithme décimal du rapport (métyrapol libre/sites libres) doit être linéaire avec une pente égale à  $2,3/k_1(b-a)$ . La fig. 33 donne la vérification expérimentale.

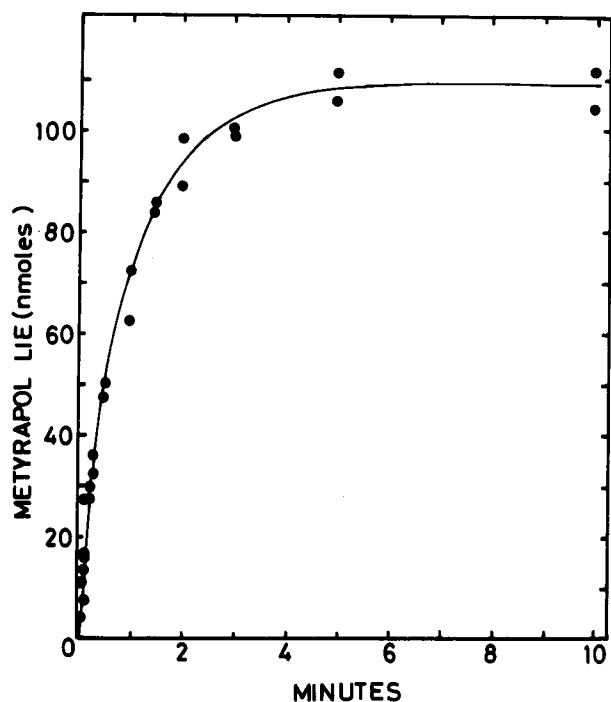


Fig. 32. Cinétique d'association du metyrapol avec les mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Les mitochondries (0,35 mg) sont ajoutées au temps zéro à 2 ml de milieu salin à 0°C, pH 7,2, contenant  $1,2 \times 10^{-7}$  M de metyrapol tritié. Les incubations sont stoppées par filtration rapide à travers un filtre Millipore adapté à une seringue. Seul le metyrapol libre est mesuré, le metyrapol lié est déduit par différence entre le metyrapol total et libre.

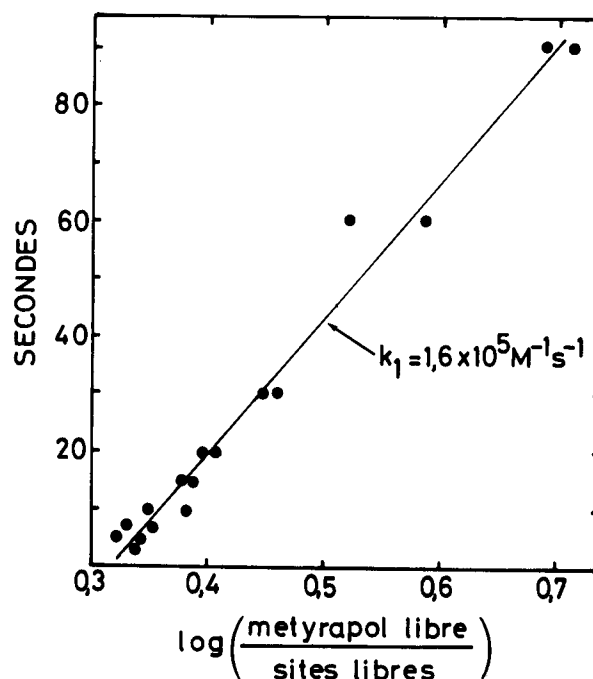


Fig. 33. Analyse des résultats de la cinétique d'association

A partir des résultats de la Fig. 32, le temps (pour les valeurs inférieures à 90 secondes) est tracé en fonction du logarithme (metyrapol libre/sites libres). La concentration totale en sites de fixation déterminée indépendamment (par mesure de la fixation en présence de  $2 \mu\text{M}$   $^3\text{H}$ -metyrapol, concentration pour laquelle les sites sont saturés) est de  $5,8 \times 10^{-8}$  M. La pente de la meilleure droite est déterminée par régression linéaire.

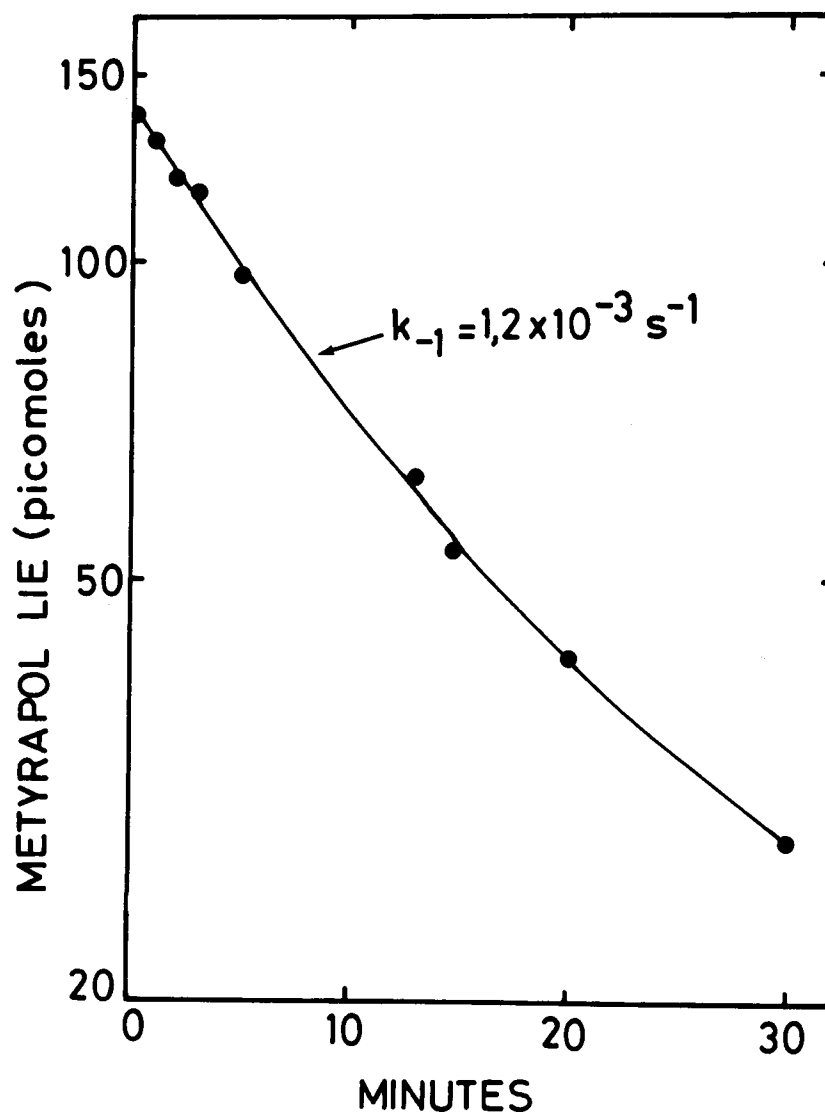


Fig. 34. Cinétique de dissociation du metyrapol avec les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Les mitochondries de cortex surrénal (0,18 mg/ml) sont suspendues dans du milieu salin à 0°C, pH 7,2 contenant  $1,3 \times 10^{-7}$  M  $^3\text{H}$ -metyrapol. Après 10 minutes d'incubation à 0°C un échantillon contrôle (temps zéro) de 2 ml est prélevé juste avant l'addition de metyrapol non-marqué ( $5 \times 10^{-5}$  M). Des portions de 2 ml sont alors prises aux temps indiqués.

Les échantillons prélevés sont immédiatement filtrés sous vide sur filtre Millipore.



La valeur de la constante cinétique d'association  $k_1$  déduite de la pente moyenne obtenue par régression linéaire est  $k_1 = 1,6 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . La mesure de la vitesse de dissociation est également effectuée par filtration rapide. Les mitochondries sont d'abord incubées avec le métyrapol tritié pendant un temps suffisant pour que l'équilibre soit atteint (10 min.), puis l'addition d'un large excès de métyrapol non radioactif empêche toute réassociation ultérieure de métyrapol tritié. La constante cinétique de dissociation  $k_{-1}$  est calculée en supposant une réaction de premier ordre, elle a pour valeur :  $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  (fig. 34). Ces deux constantes cinétiques de réaction  $k_1$  et  $k_{-1}$  permettent le calcul de la constante de dissociation  $k_d$  à l'équilibre,  $k_d = k_1/k_{-1}$ , ici  $k_d = 7,5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ . Cette valeur de  $k_d$  est très comparable à celles obtenues directement par des mesures à l'équilibre, (voir plus loin).

## 2.2. Etude cinétique de la spécificité des sites de fixation du métyrapol.

La spécificité des sites de fixation du métyrapol a été appréciée par la mesure du relâchement du métyrapol radio-actif après l'addition de divers ligands, compétiteurs présumés : métyrapone, désoxycorticostérone, corticostérone, androsténone, progestérone et  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone. La désoxycorticostérone et l'androsténone ont été choisies car ces stéroïdes sont substrats du système de  $11\beta$ -hydroxylation mitochondriale. La progestérone et la  $17\alpha$ -hydroxyprogestérone sont des substrats préférentiels pour le système de  $21$ -hydroxylation des microsomes. Le métyrapol lui-même ainsi que la diméthyl formamide qui est le solvant utilisé pour les additions de stéroïdes, sont inclus comme témoins. Les vitesses de relâchement du métyrapol tritié après addition de métyrapol ou de métyrapone sont égales (fig. 35). Ceci confirme à nouveau les propriétés identiques de ces deux ligands.

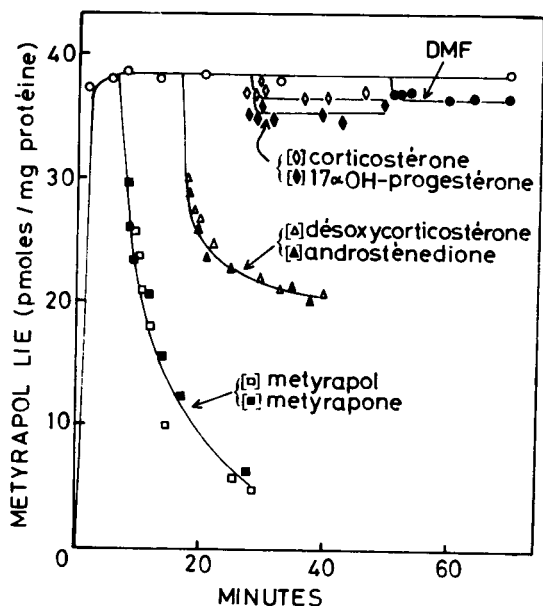


Fig. 35. Spécificité  
du déplacement  
du metyrapol tritié

Les mitochondries (110 mg) sont ajoutées au temps zéro à 100 ml de milieu salin à 0°C, pH 7,2, contenant  $4,1 \times 10^{-8}$  M  $^3\text{H}$ -metyrapol. Aux temps signalés, des portions de 10 ml du milieu d'incubation sont transférées en présence de  $3,3 \times 10^{-5}$  M metyrapol ou  $5 \times 10^{-5}$  M metyrapone ou  $2 \times 10^{-4}$  M désoxycorticostérone, androsténédione, corticostérone, 17 $\alpha$ -OH progestérone ou 0,5% diméthylformamide (DMF) (identique à la quantité introduite avec les stéroïdes). Aux temps indiqués des échantillons de 1 ml sont prélevés et filtrés sur Millipore (voir méthodes).

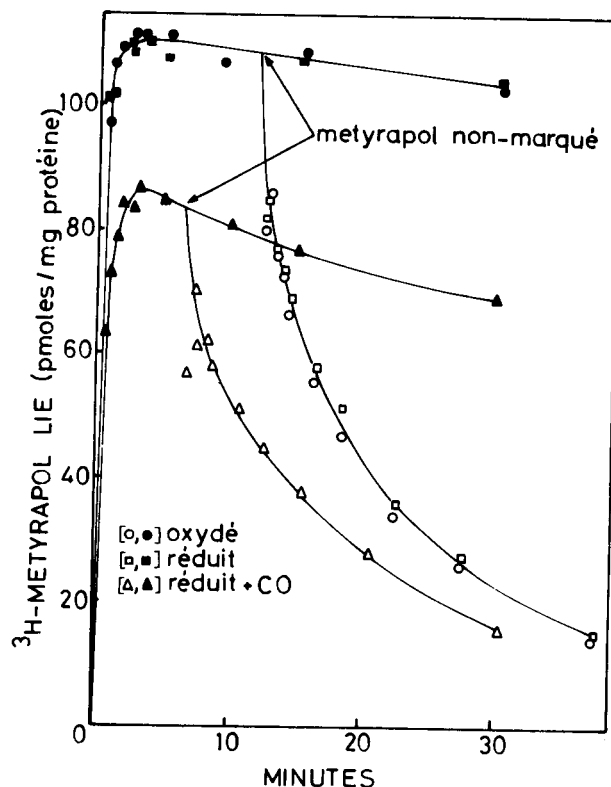


Fig. 36. Effet  
de la réduction  
par le dithionite de sodium  
et de l'oxyde de carbone  
sur la cinétique  
de fixation du metyrapol  
sur les mitochondries  
de cortex surrénal.

Les mitochondries (48 mg) sont suspendues dans 100 ml de milieu salin à 0°C, pH 7,2, et divisées en trois fractions. La première est conservée comme contrôle oxydé ; la seconde est réduite par le dithionite de sodium (10 mM) ; dans la troisième, réduite par le dithionite de sodium (10 mM), de l'oxyde de carbone est barboté pendant 3 minutes.

Les incubations sont initiées par addition de metyrapol tritié :  $5,5 \times 10^{-8}$  M. Comme indiqué, du metyrapol non-radioactif est ajouté à une portion de 12 ml des milieux d'incubation à une concentration finale de  $2,7 \times 10^{-5}$  M.

Aux temps voulus, des échantillons de 1 ml sont prélevés et rapidement filtrés sur Millipore. (voir Méthodes)

Sur la même figure, le métyrapol tritié est déplacé par la désoxycorticostérone et l'androstènedione, à l'opposé la corticostérone, la 17 $\alpha$ -hydroxyprogestérone et la progestérone sont inactives, de même d'autres essais nous ont montré que le cholestérol et 20 $\alpha$ -hydroxycholestérol étaient inactifs.

Ces expériences confirment la compétition précédemment décrite entre la désoxycorticostérone et le métyrapol.

### 2.3. Effets de la réduction par le dithionite de sodium et de l'oxyde de carbone sur la fixation du métyrapol tritié.

La cinétique de fixation du métyrapol n'est pas modifiée par réduction par le dithionite de sodium (10 mM) (fig. 36). L'oxyde de carbone se combine au cytochrome P-450 ferreux pour former un complexe CO-cyt P-450 inactif. L'action simultanée du dithionite de sodium et de l'oxyde de carbone entraîne une diminution de 20 % environ de la capacité de fixation ainsi qu'une diminution de 50 % de la vitesse de dissociation du <sup>3</sup>H-métyrapol après addition de métyrapol non marqué.

## 3. FIXATION DE <sup>3</sup>H-METYRAPOL SUR LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL : MESURES A L'EQUILIBRE.

### 3.1. Mesures directes.

La fixation du métyrapol radio-actif a été mesurée dans une gamme de concentration étendue : 10<sup>-8</sup> à 10<sup>-6</sup> M. Les éventuels effets de la concentration en protéine ainsi que de la technique employée pour la séparation des fractions liées et libres (centrifugation ou filtration) ont été examinées. La quantité totale de protéine a varié de 0,2 à 4,9 mg. La filtration sur Millipore (0,45  $\mu$ ) n'a pas été utilisée pour des quantités supérieures à 1-1,5 mg de protéine car alors les vitesses de filtration sont trop lentes et le temps de lavage devient trop long.

Deux courbes représentatives des résultats de fixation tracées selon Scatchard (118) sont présentées sur la fig. 37. Avec les quantités de protéine utilisées pour la technique de filtration, les courbes de Scatchard sont linéaires ; par la méthode de centrifugation où des quantités élevées de protéine sont utilisées, les courbes de Scatchard sont plus complexes. Aux faibles concentrations en métyrapol, les points représentatifs se placent sur une droite presque verticale correspondant à une affinité très faible ; aux concentrations supérieures en métyrapol la courbe correspond à une fixation de forte affinité similaire à celle obtenue par la technique de filtration. Nous avons donc affaire à un système très paradoxal où aux faibles concentrations en métyrapol l'occupation des sites commence par des sites d'affinité réduite. Diverses hypothèses peuvent expliquer ce comportement :

- a) présence de ligands endogènes (par exemple de stéroïdes comme la désoxycorticostérone, le désoxycortisol) qui perturbent l'équilibre de fixation du métyrapol ;
- b) transition coopérative entre deux conformations des sites de fixation ;
- c) limitation par une barrière de diffusion de la fixation du métyrapol. La diffusion est particulièrement limitante aux faibles concentrations en métyrapol.

Le nombre de sites de fixation ainsi que les constantes de dissociation sont déterminés par extrapolation des portions linéaires des courbes de Scatchard. Les valeurs moyennes obtenues dans des conditions standard à 0°C et pH 7,2 sont données dans le tableau ci-dessous (Tableau 7). Le nombre maximal de sites de fixation obtenu par les deux méthodes (centrifugation et filtration) est identique : environ 0,5 nanomoles/mg protéine. Par contre, la constante de dissociation ( $K_d$ ) est légèrement plus faible par la méthode de filtration, ce qui correspond à une affinité plus forte : il est vraisemblable que l'étape de lavage des mitochondries sur le filtre permet de détacher des molécules de métyrapol simplement piégées ou faiblement liées aux mitochondries.

TABEAU 7

Caractéristiques de la fixation du métyrapol  
sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Technique	Nombre de sites (nmoles/mg de protéine)	Constante de dissociation $K_d$ (Molaire)	Concentration en protéine (mg/ml)
Centrifugation	$0,45 \pm 0,06$	$(1,6 \pm 0,3) \times 10^{-8}$	$0,2 - 2,5$
Filtration sur Millipore	$0,48 \pm 0,09$	$(1,0 \pm 0,01) \times 10^{-8}$	$0,05 - 0,24$

La fixation du métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal a été mesurée dans le milieu salin standard (voir "Méthodes") à 0°C et pH 7,2. Les chiffres indiqués pour le nombre de sites de fixation et leur constante de dissociation représentent la moyenne ( $\pm$  la déviation standard) de 5 expériences indépendantes pour chacune des deux techniques.

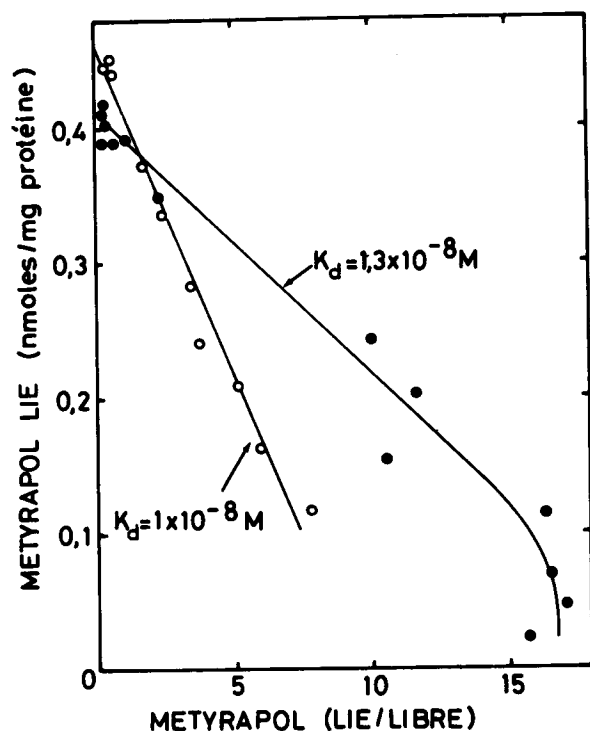


Fig. 37. Fixation  
du metyrapol radioactif  
sur les mitochondries de  
cortex surrénal de boeuf

Les tubes contenaient pour un volume final de 5 ml de milieu salin à 0°C, pH 7,2, une concentration variable de  $^3\text{H}$ -metyrapol de  $1,6 \times 10^{-8}$  à  $1,6 \times 10^{-6}\text{M}$ . L'incubation était initiée par l'addition des mitochondries : 3,7 mg de protéine (●) ou 0,94 mg de protéine (○). Après 15 minutes, les mitochondries sont séparées du milieu d'incubation par centrifugation (●) ou filtration (○) et la radioactivité liée aux mitochondries est mesurée.

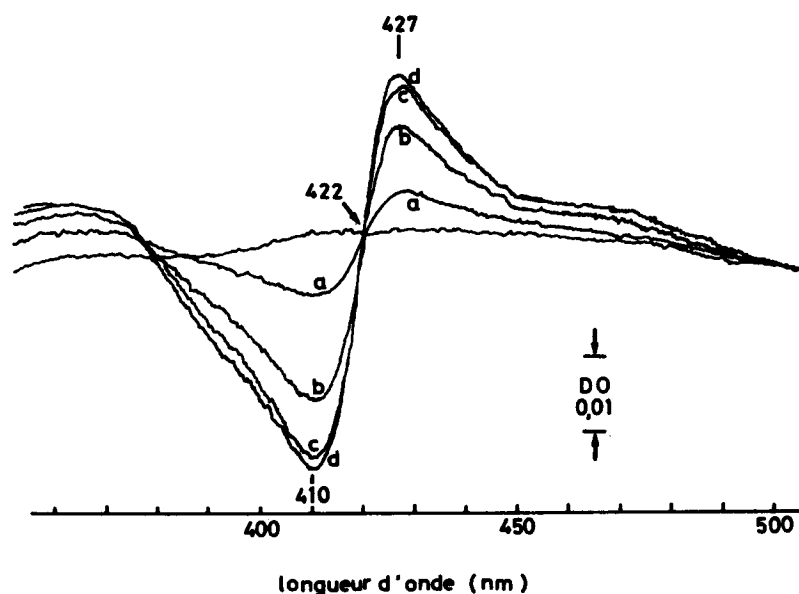


Fig. 38. Titration spectrale  
des mitochondries de cortex surrénal de boeuf  
par le metyrapol.

Les mitochondries sont suspendues dans un milieu mixte salin-saccharose (voir Fig. 23) pour obtenir une concentration finale de 2,6 mg de protéine/ml et distribuées dans deux cuvettes de spectrophotomètre. Après enregistrement de la ligne de base, le metyrapol est ajouté dans la cuvette test et la même quantité de tampon dans la référence (le volume total des additions est inférieur à 20  $\mu\text{l}$  pour 3 ml de suspension). Les spectres différentiels sont alors enregistrés : (a) 0,69  $\mu\text{M}$  ; (b) 1,7  $\mu\text{M}$  ; (c) 3,5  $\mu\text{M}$  et (d) 10,1  $\mu\text{M}$  metyrapol.

### 3.2. Fixation de métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal. Titration spectrale.

L'addition de métyrapol à une suspension de mitochondries de cortex surrénal produit un spectre différentiel caractéristique, identique à celui de la métyrapone (114). Au niveau de la bande de Soret, le maximum d'absorption est à 427-428 nm et le trou à 410 nm. Le point isosbestique est à 420 nm. Des spectres similaires observés avec les microsomes de foie de rat, ont été appelés type II (par opposition à l'interaction spectrale des substrats : type I). La fig. 38 montre la titration du changement spectral de type II produit par des additions croissantes de métyrapol. Une constante apparente de dissociation  $K_{app}$  (constante spectrale de dissociation) est obtenue en traçant l'inverse de la densité optique en fonction de l'inverse de la concentration du métyrapol : l'intersection avec l'axe des abscisses est  $-1/K_{app}$  ; dans les conditions de la figure 38,  $K_{app} = 2 \mu M$ . L'amplitude maximale de l'interaction spectrale du métyrapol :  $\Delta D_0$  (428-410 nm) est environ 0,020 pour une concentration en protéines mitochondriales de 1 mg/ml. Cette valeur est plus faible que l'amplitude maximale de l'interaction spectrale de la désoxycorticostérone  $\Delta D_0$  (385-420 nm) qui est de 0,050 pour une concentration en protéines de 1 mg/ml. La valeur très élevée de la constante spectrale de dissociation ( $K_{app} = 2 \cdot 10^{-6} M$ ) par rapport au  $K_d$  ( $10^{-8} M$ ), mesuré directement semble suggérer qu'il n'existe pas de corrélation quantitative entre les effets optiques et la fixation, mesurée avec le métyrapol tritié. Néanmoins, la constante spectrale  $K_{app}$  est très surestimée par rapport à sa valeur réelle car, dans les mesures optiques décrites ci-dessus, la concentration du ligand libre n'est pas connue et le graphique inverse est tracé en fonction du métyrapol total. Notons ici que la quasi-totalité des publications présentant des titrations spectrales confondent le ligand total et le ligand libre : ceci n'est pas valable pour les interactions de forte affinité. Une interprétation complète des interactions spectrales n'est possible que lorsque les divers coefficients d'absorption du cytochrome P-450 sont connus avec précision, par exemple dans le cas du cytochrome P-450 purifié des bactéries "Pseudomonas putida"(130).

### 3.3. Inactivation thermique de la fixation de métyrapol. Corrélation avec les effets spectraux.

La sensibilité thermique de la fixation du métyrapol a été étudiée en incubant tout d'abord des mitochondries de cortex surrénal dans du milieu salin à diverses températures pendant trois minutes. La fixation est ensuite mesurée à 0°C avec une concentration saturante de métyrapol ce qui permet de mesurer le nombre total de sites de fixation. La fig. 39 montre que le site de fixation n'est pas affecté à 40°C mais qu'une inactivation brutale a lieu à 50-55°C. La fixation est complètement abolie par 3 min. d'incubation à 60°C ou 70°C. La cinétique d'inactivation a été mesurée à 51°C et a été trouvée du premier ordre au moins pendant les premières minutes ; une très bonne protection est fournie par le métyrapol (8  $\mu$ M) (fig. 40). Les caractéristiques de l'inactivation thermique, en particulier la protection par le ligand, sont de bonnes indications pour une nature protéique du site de fixation.

Une corrélation étroite a été trouvée entre la disparition, d'une part, du spectre différentiel induit par le métyrapol, et d'autre part, de la capacité de fixation pour le métyrapol radioactif (Fig. 41). La divergence des courbes après 3 minutes est explicable par la persistance d'une faible quantité de sites non-spécifiques et par la contamination significative du culot mitochondrial par le milieu d'incubation ; en effet, les rapports métyrapol (lié/total) sont très faibles (0,03-0,04) pour assurer des conditions de saturation permettant une mesure exacte du nombre de sites de fixation.



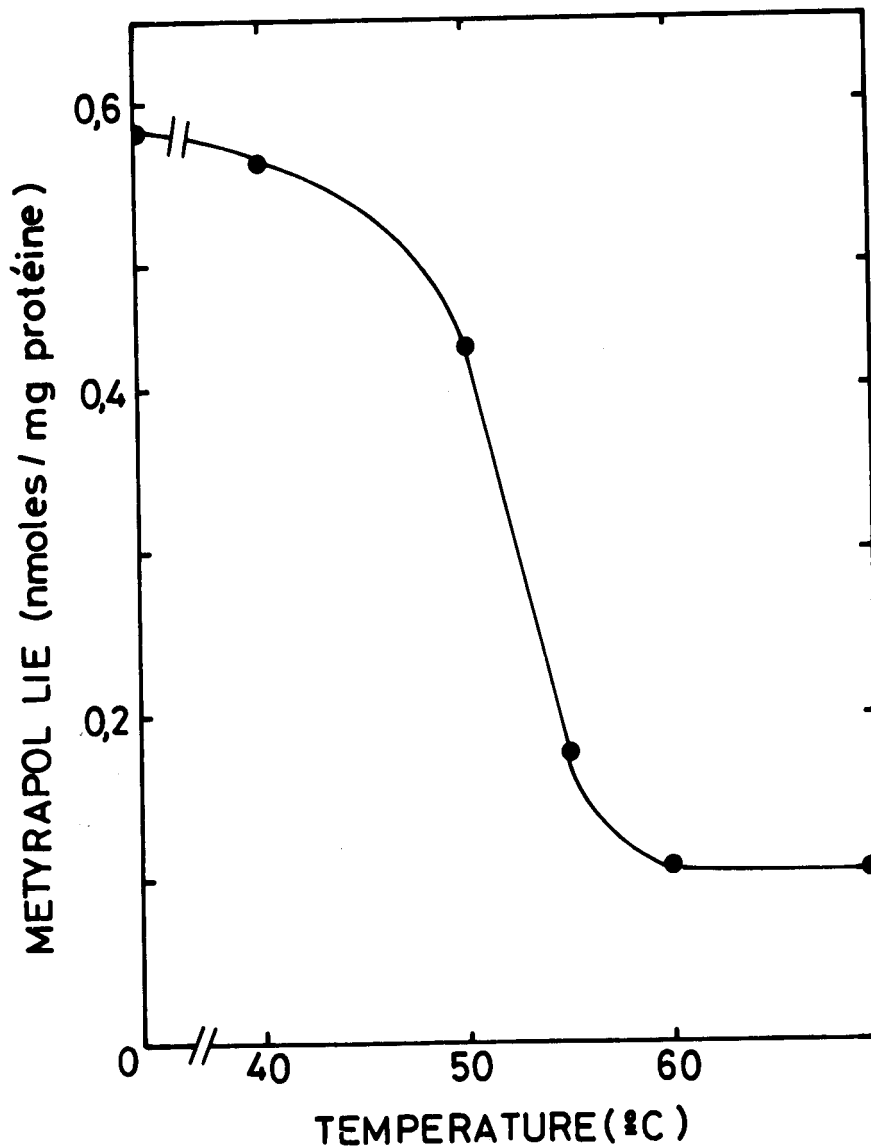


Fig. 39. Inactivation thermique irréversible  
de la fixation du metyrapol  
sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Des volumes de 1 ml de milieu salin (pH 7,2) sont équilibrés aux températures indiquées. Les mitochondries (1,1 mg de protéine, volume : 20  $\mu$ l) sont ajoutées pour initier l'incubation. Après 3 minutes, les échantillons sont rapidement refroidis par 1 ml de milieu salin à 0°C, contenant 11,8  $\mu$ M  $^3$ H-metyrapol et incubés alors à 0°C pendant 15 minutes.

Le metyrapol lié et libre est déterminé après centrifugation.

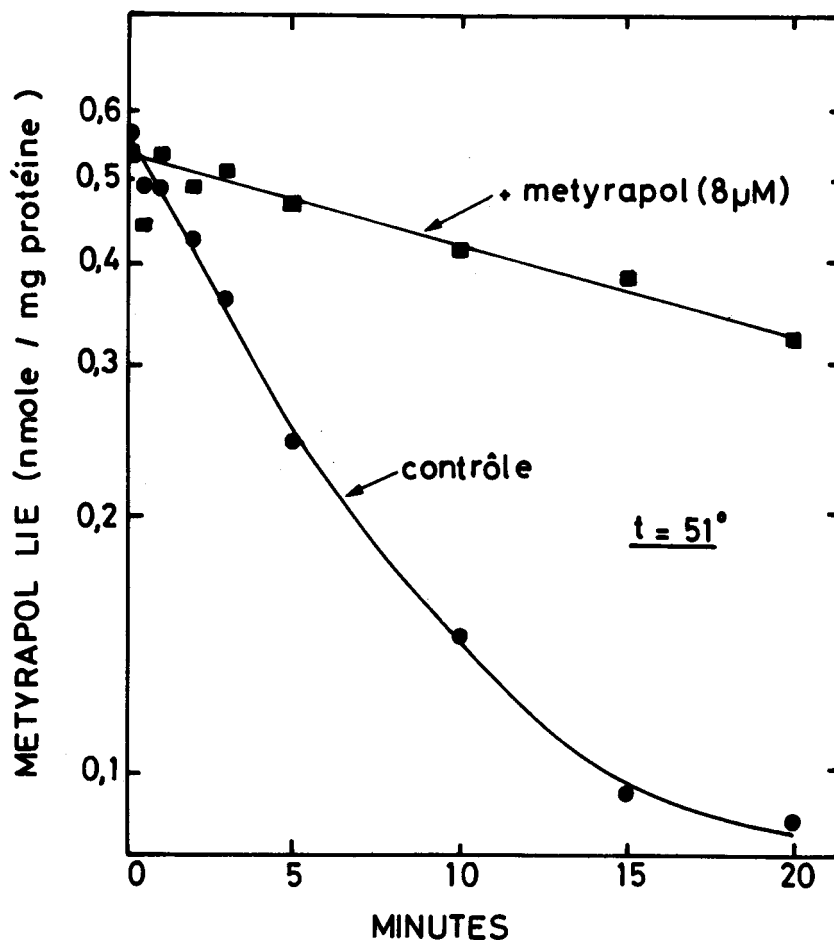


Fig. 40. Cinétique de l'inactivation thermique de la fixation du metyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.  
Protection par le metyrapol.

Contrôle. Les mitochondries (9 mg de protéine ; volume : 0,2 ml) sont ajoutées à 9,8 ml de milieu salin à 51°C. Des échantillons de 1 ml sont prélevés aux temps indiqués et immédiatement dilués par 0,98 ml de milieu salin à 0°C, pH 7,2, contenant 8,3 µM metyrapol tritié.

Metyrapol. Les mitochondries (9 mg de protéine, volume : 0,2 ml) sont ajoutées à 9,8 ml de milieu salin à 51°C contenant du metyrapol non-radioactif (8,2 µM). Aux temps requis des échantillons de 1 ml sont dilués avec 0,98 ml de milieu salin à 0°C contenant 0,1 µM <sup>3</sup>H-metyrapol la radioactivité spécifique et la concentration finale sont identiques aux conditions du contrôle.

Dans les deux cas, après 15 minutes supplémentaires d'incubation à 0°C, le metyrapol lié et libéré est déterminé après centrifugation.

Deux tubes témoins, figurés ici comme temps-zéros sont traités complètement à 0°C.

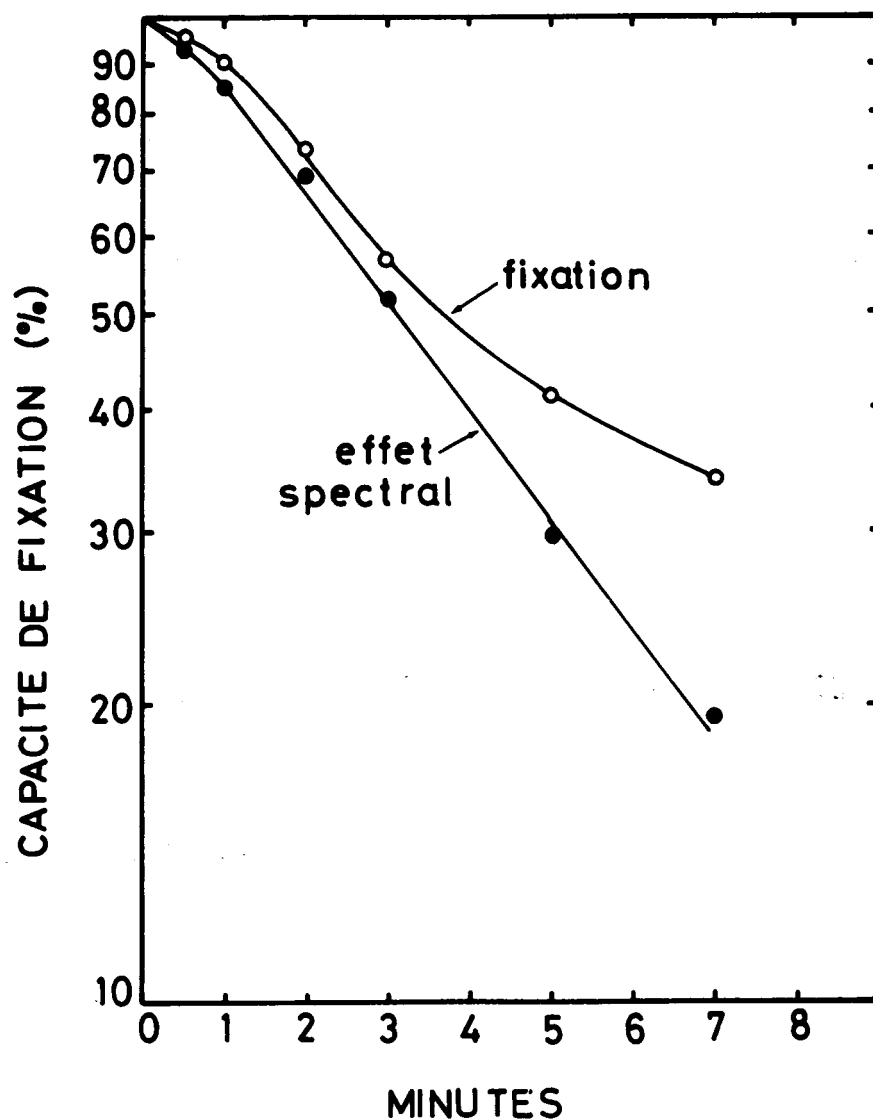


Fig. 41. Corrélation entre l'inactivation thermique de la fixation du metyrapol et la disparition du changement spectral induit par le metyrapol.

Les mitochondries sont ajoutées à du milieu salin à 51° (concentration : 4,4 mg protéine/ml). Aux temps indiqués, des échantillons de 3 ml sont prélevés et rapidement refroidis par 3 ml de milieu salin à 0°C. De ces 6 ml, 1 ml est utilisé pour mesurer la fixation du  $^3\text{H}$ -metyrapol en ajoutant 1 ml de  $^3\text{H}$ -metyrapol (10  $\mu\text{M}$ ). (Voir ci-dessus fig. 40-41). Le reste est réparti dans deux cuvettes de spectrophotomètre et le spectre différentiel produit par addition de metyrapol (5  $\mu\text{M}$ ) est enregistré. Le metyrapol lié et l'amplitude du changement spectral ( $\Delta\text{DO } 427-410 \text{ nm}$ ) sont tracés en fonction du temps comme pourcentages de contrôles traités complètement à 0°C. Les valeurs absolues de ces derniers sont : metyrapol lié : 0,54 nmole/mg de protéine et  $\Delta\text{DO } 427-410 \text{ nm} = 0,051$ .

### 3.4. Effet de la température sur la fixation du métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal.

Les mesures cinétiques nous avaient montré que la fixation de métyrapol était légèrement diminuée par une élévation de la température de 0 à 30°C. Des mesures de fixation à l'équilibre ont été réalisées à 0°-8-23 et 31°C, les courbes de Scatchard correspondant à 0° et 23°C sont montrées sur la fig. 42. La table 3 rassemble pour chaque température, le nombre de sites de fixation, les constantes de dissociation et l'énergie libre de la réaction de fixation, calculés à partir de la portion linéaire de haute affinité de la courbe de Scatchard. Le nombre de sites de fixation reste constant, confirmant qu'aucune inactivation n'a eu lieu pendant l'incubation. L'effet de la température sur la fixation du métyrapol n'est pas très important. Néanmoins, l'affinité décroît quand la température augmente. Les paramètres thermodynamiques peuvent être calculés à partir des données du tableau 8. Le tracé de  $\log(K_d)$  en fonction de  $(1/T)$  (équation de Van't Hoff) est linéaire montrant que le changement d'enthalpie ( $\Delta H$ ) est constant dans la gamme de température choisie. La variation d'enthalpie déduite de la pente est :

$$\Delta H = -1,6 \text{ kcal/mole.}$$

La variation d'entropie  $\Delta S$  est calculée par la relation :

$$\Delta G = \Delta H - T.\Delta S, \text{ ici à } 0^\circ\text{C}, \Delta S = +30 \text{ cal.mole}^{-1}.\text{deg}^{-1}.$$

Ces valeurs sont sans doute approximatives, elles montrent néanmoins que la variation négative d'énergie libre ( $\Delta G$ ) correspondant à la formation spontanée du complexe avec le métyrapol provient essentiellement de la large variation positive de l'entropie. La signification et les diverses hypothèses expliquant ces variations d'entropie ( $\Delta S$ ) positives lors de la fixation d'un ligand sur une macromolécule ont été passées en revue par Westphahl (127). Il est certain qu'avec le système membranaire complexe utilisé, toute explication précise serait très spéculative.

TABLEAU 8

Effets de la température sur la fixation  
du métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal

Température °C	Nombre de sites (nmoles/mg de protéine)	Constante de dissociation $K_d$ (M)	Variation d'énergie libre $\Delta G$ : Kcal/mole.
0	0,46	$1,7 \times 10^{-8}$	- 9,7
8	0,46	$1,9 \times 10^{-8}$	- 9,9
23	0,46	$2,1 \times 10^{-8}$	-10,4
31	0,46	$2,4 \times 10^{-8}$	-10,6

Les conditions expérimentales sont décrites dans la légende de la fig. 42.

La variation d'énergie libre  $\Delta G$  est calculée par la relation  $\Delta G = R T \ln K_D$   
où T est la température absolue, et R est égal à 1,987 cal x mole<sup>-1</sup> x deg<sup>-1</sup>.

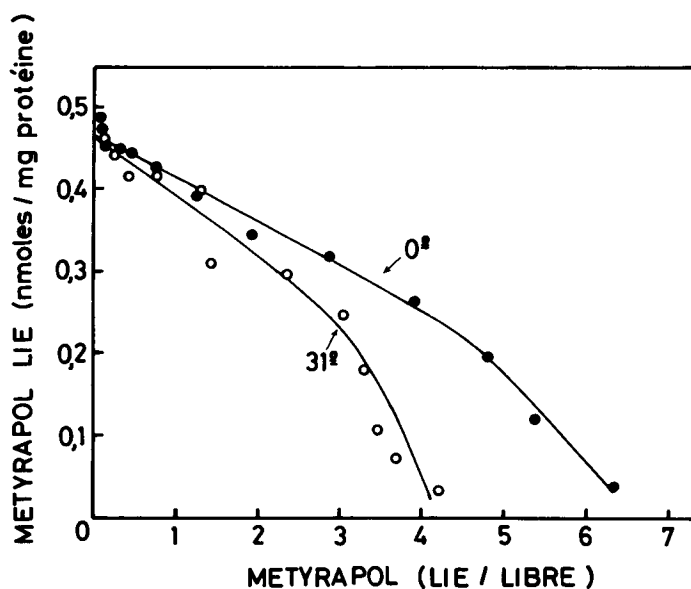


Fig. 42. Effet de la température sur la fixation du metyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf

Les mitochondries (1,7 mg) sont distribuées dans 5 ml de milieu salin, pH 7,2, contenant  $1,5 \times 10^{-8}$  -  $6,6 \times 10^{-6}$  M  $^3\text{H}$ -metyrapol. L'incubation est effectuée aux températures indiquées pendant 10 minutes et stoppée par centrifugation (voir "Méthodes").

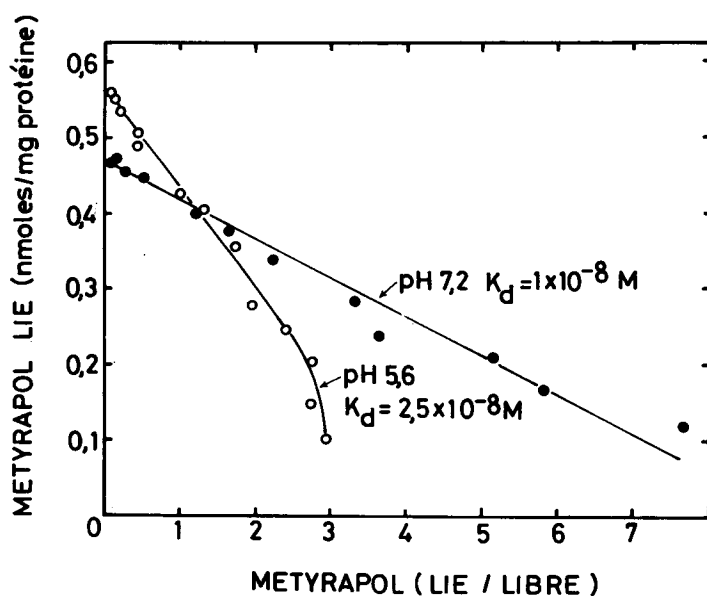


Fig. 43. Effet du pH sur la fixation du metyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf

La fixation est initiée par l'addition des mitochondries (0,94 mg) à 5 ml de milieu salin à 0°C contenant  $6,4 \times 10^{-8}$  -  $2,7 \times 10^{-6}$  M  $^3\text{H}$ -metyrapol. Après 15 minutes d'incubation à 0°C, les mitochondries sont séparées du milieu d'incubation par filtration sur Millipore. (Voir "Méthodes").

### 3.5. Effet du pH sur la fixation de métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal.

La fixation de métyrapol radio-actif a été mesurée pour diverses valeurs du pH entre 5 et 9, et à chaque pH pour deux concentrations de métyrapol :  $1,2 \cdot 10^{-8} \text{M}$  et  $2,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$ . La première sert à tester la fixation initiale sur les sites pour une faible concentration ; la seconde est saturante et donnera approximativement le nombre maximal de sites de fixation. Le seul résultat majeur de la variation de pH est une décroissance du nombre maximal de sites quand le pH est augmenté. La fixation, dans une gamme complète de concentration en métyrapol, a été mesurée à pH 5,6 et pH 7,2 (fig. 43), le  $K_d$  à pH 5,6 est environ doublé par rapport à celui à pH 7,2 indiquant une diminution d'affinité. Ces effets du pH sont la résultante d'une modification du site de fixation membranaire lui-même et aussi de la variation de la protonation des noyaux pyridine du métyrapol.

### 4. ACTION DU CYCLOHEXYLISOCYANIDE SUR LA FIXATION DU METYRAPOL SUR LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL DE BOEUF.

Les dérivés isocyanide ou carbylamine ( $R - N = C$ ) sont des réactifs du fer du groupement héminique ; ils forment des composés avec l'hémoglobine, la peroxidase (134) (135) et le cytochrome P-450 (136)-(140). Leur mode d'action est analogue à celui de l'oxyde de carbone. Ce sont des liquides et leur manipulation quantitative est plus facile que celle d'un gaz comme l'oxyde de carbone.

L'effet du cyclohexylisocyanide sur la fixation du métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf a été étudiée, d'une part, par l'examen des interactions spectrales du cyclohexylisocyanide et du métyrapol, et d'autre part, directement, au niveau de la fixation du métyrapol tritié.

#### 4.1. Compétitions spectrales du cyclohexylisocyanide et du métyrapol.

Les spectres différentiels produits par l'addition de 10 et 100  $\mu\text{M}$  cyclohexylisocyanide aux mitochondries de cortex surrénal oxydées sont montrés sur la fig. 44 (a,b). Le spectre différentiel est caractérisé par un pic d'absorption à 434 nm et un minimum d'absorption entre 390 et 420 nm (140). Il y a lieu de noter l'élargissement caractéristique du minimum d'absorption avec la concentration en isocyanide la plus élevée. La constante spectrale de dissociation ( $K_s$ ), obtenue en traçant l'inverse de l'amplitude de l'interaction spectrale ( $\Delta\text{D}_{434 \text{ nm-trou}}$ ) en fonction de l'inverse de la concentration totale en isocyanide, est environ 9  $\mu\text{M}$  et l'amplitude maximale de l'interaction spectrale est de 0,085 pour une concentration en protéine de 1 mg/ml.

Pour analyser l'effet du cyclohexylisocyanide sur l'interaction du métyrapol, les mitochondries sont d'abord suspendues dans un milieu contenant 100  $\mu\text{M}$  cyclohexylisocyanide, pour saturer tous les sites réactifs puis distribuées dans les deux cuvettes du spectrophotomètre ; 5  $\mu\text{M}$  de métyrapol est alors ajouté à la cuvette-test et le spectre différentiel est enregistré (fig. 44).



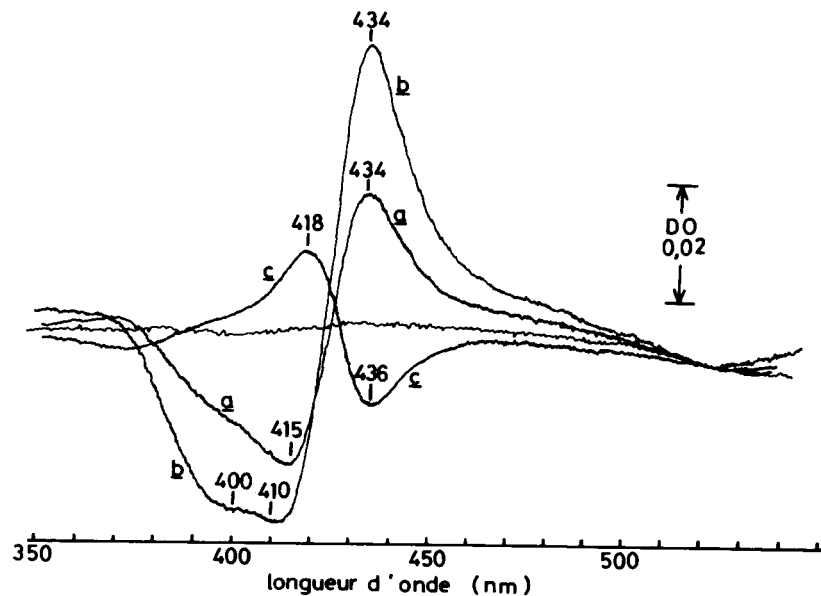


Fig. 44

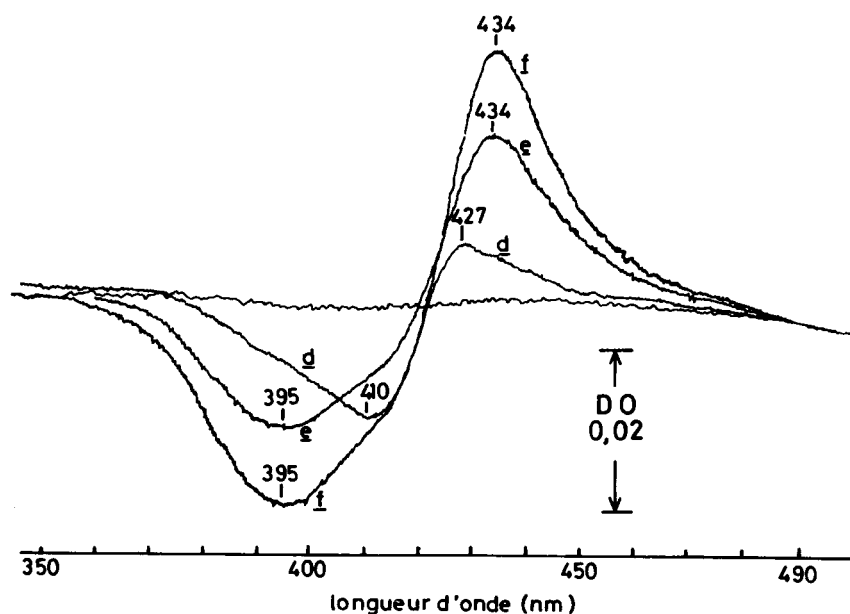


Fig. 45

Fig. 44 et 45. Interactions spectrales du cyclohexylisocyanide et du metyrapol avec les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

Les mitochondries sont suspendues dans un milieu mixte salin-saccharose (voir fig. 23) à la concentration finale de 1 mg/ml. Les spectres différentiels sont enregistrés après les additions suivantes :

Fig. 44. (a) 10  $\mu$ M ; (b) 100  $\mu$ M cyclohexylisocyanide (c) (100  $\mu$ M cyclohexylisocyanide + 5  $\mu$ M metyrapol) dans la cuvette test et 100  $\mu$ M cyclohexylisocyanide dans la cuvette de référence.

Fig. 45. (d) 10  $\mu$ M metyrapol ; (e) (50  $\mu$ M cyclohexylisocyanide + 10  $\mu$ M metyrapol) dans la cuvette test et 10  $\mu$ M metyrapol dans la référence ; (f) (150  $\mu$ M cyclohexylisocyanide + 10  $\mu$ M metyrapol) dans le test et 10  $\mu$ M metyrapol dans la référence.

L'allure de la courbe est pratiquement inverse du spectre-contrôle obtenu avec le métyrapol seul (voir chapitre IV). Le pic et le trou d'absorption sont maintenant à 418 et 436 nm. Le métyrapol ajouté dans la cuvette-test déplace une partie du cyclohexylisocyanide fixé, les deux cuvettes ne sont, dès lors, plus équilibrées pour le cyclohexylisocyanide et la courbe c est la résultante de l'interaction spectrale propre au métyrapol et du déséquilibre de l'interaction spectrale de l'isocyanide.

Une autre preuve de la compétition entre le métyrapol et l'isocyanide est apportée par une expérience spectrale symétrique de l'expérience décrite ci-dessus : les mitochondries sont suspendues dans un milieu contenant 10  $\mu\text{M}$  métyrapol, pour saturer tous les sites caractéristiques de ce ligand (fig. 45) 50  $\mu\text{M}$  (e) et 150  $\mu\text{M}$  (f) de cyclohexylisocyanide sont alors ajoutés à la cuvette-test. Les spectres différentiels obtenus montrent que le métyrapol empêche une interaction spectrale complète du cyclohexylisocyanide. Cet effet est particulièrement apparent dans le minimum d'absorption très déformé (390-420 nm) et dans l'amplitude réduite de l'interaction spectrale ( $\Delta D_0$  434 nm-trou) (comparer avec les spectres (a, b) (fig. 44).

#### 4.2. Inhibition par le cyclohexylisocyanide de la fixation du métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal.

Sur la fig. 46 sont montrées les courbes de Scatchard de la fixation du métyrapol tritié sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf. Aucune différence n'est observable entre la courbe contrôle (mitochondries oxydées), et la courbe contrôle (mitochondries réduites par 5 mM dithionite).

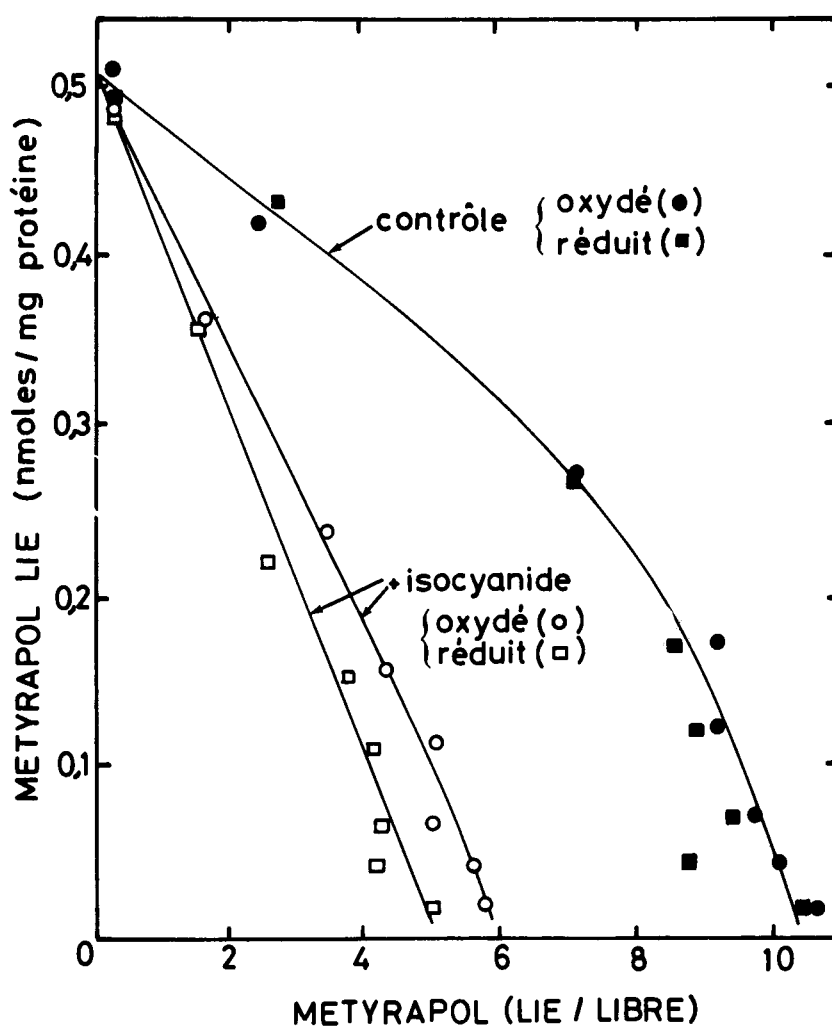


Fig. 46. Fixation du metyrapol  
sur les mitochondries oxydées et réduites.  
Inhibition par le cyclohexylisocyanide.

Les mitochondries (2,1 mg de protéine) sont ajoutées au milieu salin à 0°C, pH 7,2, contenant  $2,4 \times 10^{-8}$  -  $2,4 \times 10^{-6}$  M  $^3$ H-metyrapol. Le volume total est 2 ml. Après 10 minutes d'incubation à 0°C, la réaction est stoppée par centrifugation.

Ces conditions constituent un contrôle oxydé (●) ; les autres conditions sont les suivantes :

réduit par  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  5mM (■) ; cyclohexylisocyanide 10  $\mu$ M (○) et ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  5 mM + cyclohexylisocyanide 10  $\mu$ M) (□).

Les courbes déterminées en présence de 10  $\mu\text{M}$  cyclohexylisocyanide démontrent que ce dernier est un inhibiteur compétitif de la fixation du métyrapol dans l'état oxydé ( $K_i = 7 \mu\text{M}$ ) comme dans l'état réduit ( $K_i = 5 \mu\text{M}$ ). L'inhibition légèrement plus forte obtenue dans l'état réduit est en accord avec les observations générales de Ichikawa et Yamano (139) qui montrent une affinité plus élevée de divers isocyanides pour la forme réduite du cytochrome P-450 des microsomes de foie de rat.

## 5. INHIBITION DE LA FIXATION DU METYRAPOL PAR DIVERS STEROIDES.

Les expériences cinétiques décrites précédemment ont montré que des stéroïdes, substrats du système de  $11\beta$ -hydroxylation pouvaient déplacer le  $^3\text{H}$ -métyrapol fixé. Ces résultats ont été prolongés par des études spectrales et des mesures de la fixation à l'équilibre.

### 5.1. Interaction spectrale du métyrapol et de la désoxycorticostérone.

L'action du métyrapol sur l'interaction spectrale de la désoxycorticostérone a été montrée au chapitre IV (A). L'expérience réciproque, c'est-à-dire l'effet de la DOC sur l'interaction spectrale du métyrapol est analysé ci-dessous. (fig. 47). Les mitochondries sont mises en suspension en présence de 20  $\mu\text{M}$  DOC puis réparties dans les deux cuvettes du spectrophotomètre. Après addition de 2,5  $\mu\text{M}$  métyrapol uniquement dans la cuvette expérimentale, le spectre différentiel c est enregistré.

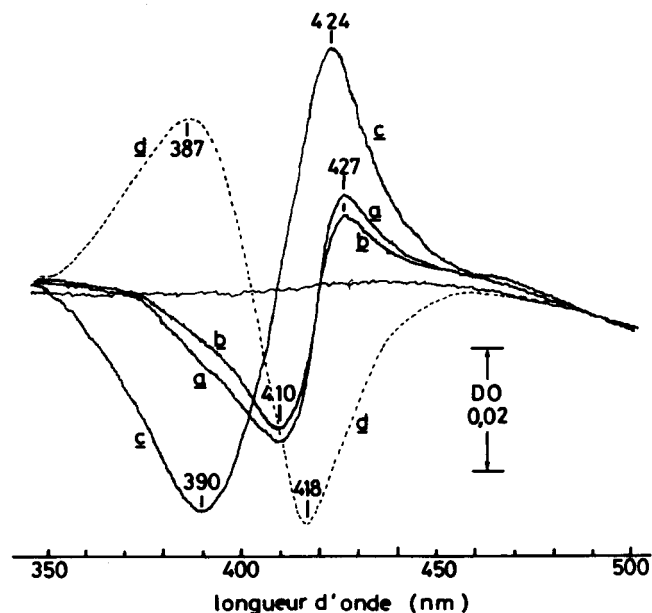


Fig. 47. Interaction spectrale du metyrapol avec les mitochondries de cortex surrénal.  
Effet de la désoxycorticostérone.

Les mitochondries sont suspendues dans un milieu mixte salin-saccharose (voir fig. 23) à la concentration finale de 1,9 mg/ml.

Les spectres différentiels sont enregistrés après les additions suivantes :

(a) 2,5  $\mu$ M metyrapol ; (b) (2,5  $\mu$ M metyrapol + 20  $\mu$ M DOC) ; (c) (2,5  $\mu$ M metyrapol + 20  $\mu$ M DOC) dans la cuvette test et 20  $\mu$ M DOC dans la cuvette référence.

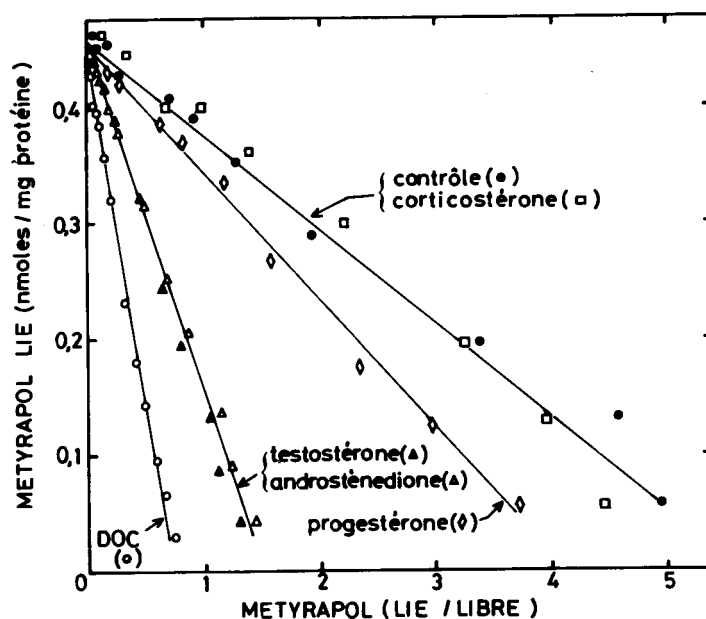


Fig. 48. Inhibition par divers stéroïdes de la fixation du metyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

La fixation est mesurée à 0°C, pH 7,2, dans du milieu salin contenant  $1,5 \times 10^{-8}$  -  $4 \times 10^{-6}$  M  $^3$ H-metyrapol. Les mitochondries (1,1 mg) sont ajoutées pour initier la réaction. Le volume total est 2 ml. Après 10 minutes d'incubation à 0°C la réaction est stoppée par centrifugation.

Chaque stéroïde est utilisé à la concentration de 20,5  $\mu$ M ; le contrôle contient une quantité de diméthylformamide identique à celle introduite avec les stéroïdes.

Il ressemble à un spectre amplifié caractéristique du métyrapol, mais le tracé est plus symétrique et le maximum et le minimum d'absorption sont déplacés vers les faibles longueurs d'onde (424 nm et 390 nm, respectivement). Le métyrapol ajouté dans la cuvette-test déplace la DOC de son site de fixation ; les deux cuvettes ne sont donc plus équilibrées pour l'interaction de la DOC puisque moins de DOC reste fixé dans la cuvette-test par rapport à la référence. Le spectre c est donc composite : il peut être reconstruit par la différence entre une interaction spectrale métyrapol (courbe b) et une interaction spectrale DOC (courbe d).

## 5.2. Inhibition par les stéroïdes de la fixation du $^3\text{H}$ -métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal.

En plus de la DOC qui avait été choisie comme modèle pour les études spectrales, divers stéroïdes ont été testés comme compétiteurs éventuels de la fixation de  $^3\text{H}$ -métyrapol : corticostérone, androsténedione, testostérone et progestérone. Les stéroïdes ont été ajoutés sous forme d'un petit volume d'une solution dans la diméthyl formamide. Une quantité identique de solvant (0,1 %) a été incluse dans les contrôles. La désoxycorticostérone et l'androsténedione sont des substrats pour la 11 $\beta$ -hydroxylation, la corticostérone est le produit de la 11 $\beta$ -hydroxylation. Sharma et al (141) ont démontré que la testostérone inhibait la 11 $\beta$ -hydroxylation de la DOC. La progestérone est un substrat caractéristique des systèmes d'hydroxylation en 17 $\alpha$ - et 21- localisée dans les microsomes de cortex, la 11 $\beta$ -progestérone a néanmoins été décrite (142). La fig. 48 montre que la corticostérone, au moins à la concentration utilisée (20  $\mu\text{M}$ ), n'a pas d'action sur la fixation de métyrapol ; tous les autres stéroïdes sont des inhibiteurs compétitifs. La DOC est le meilleur stéroïde compétiteur avec un  $K_i$  de 3  $\mu\text{M}$ . L'inhibition de la fixation du  $^3\text{H}$ -métyrapol par la DOC a été mesurée pour diverses concentrations de DOC. Dans tous les cas, l'inhibition est compétitive mais le  $K_i$  apparent augmente de 1 à 3  $\mu\text{M}$  quand la concentration totale en DOC est augmentée de 0,6 à 20  $\mu\text{M}$ .

Cet effet est vraisemblablement provoqué par la fixation propre de la DOC sur les mitochondries de cortex surrénal. La testostérone et l'androsténone ont des pouvoirs inhibiteurs analogues ( $K_i$  respectifs : 7 et 8  $\mu\text{M}$ ), en accord avec leurs actions similaires sur la 11 $\beta$ -hydroxylation (141). La progestérone est un inhibiteur peu puissant de la fixation du métyrapol ( $K_i = 60 \mu\text{M}$ ).

#### 6. FIXATION DU METYRAPOL SUR LES MEMBRANES EXTERNES ET INTERNES DES MITOCHONDRIES ET SUR LES MICROSOMES DU CORTEX SURRENAL.

La spécificité subcellulaire de la fixation du métyrapol a été évaluée par la mesure de la fixation de métyrapol tritié sur les membranes mitochondriales isolées (externe et interne) et sur les microsomes du cortex surrénal. Pour faciliter la comparaison, la même gamme de concentration de métyrapol, ainsi que des quantités comparables de protéine, ont été utilisées. Les résultats obtenus sont représentés sur la Fig. 49 où la quantité de métyrapol fixée sur les diverses membranes est tracée en fonction du logarithme de la concentration en métyrapol libre. Seule la membrane interne possède un nombre substantiel de sites de fixation. L'existence des sites observés au niveau des membranes externes mitochondriales ou des microsomes de cortex surrénal est explicable par la contamination des deux dernières fractions par des mitochondries ou des fragments de mitochondries.

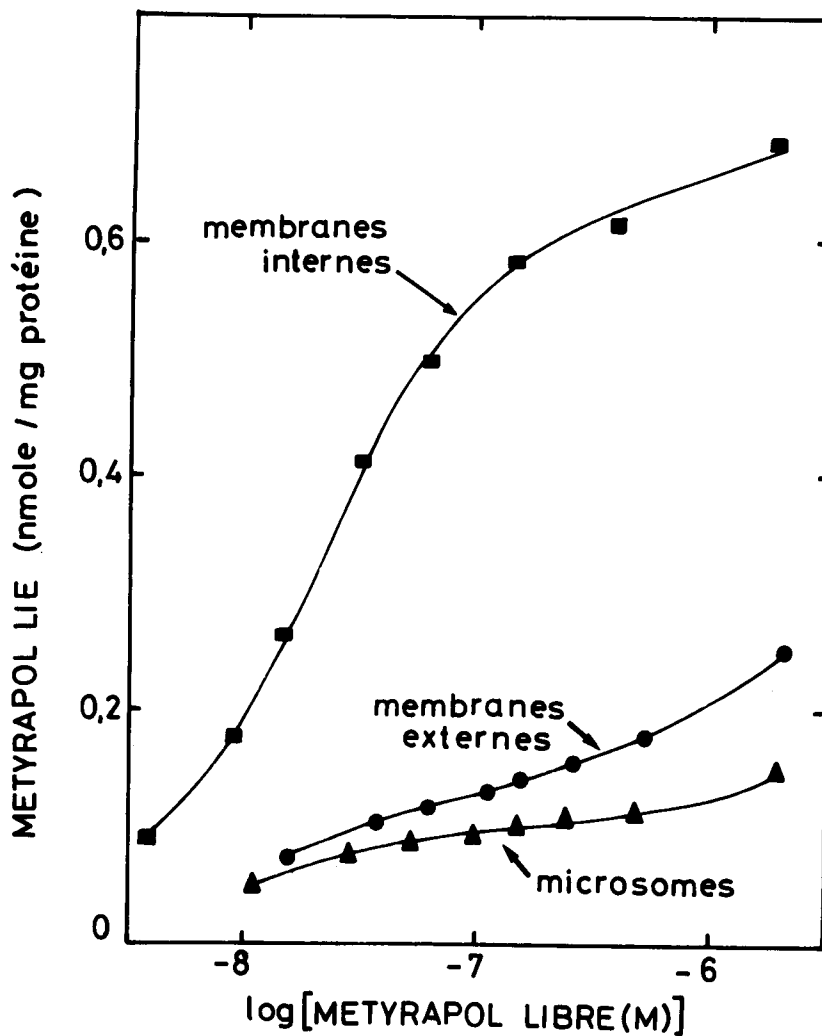


Fig. 49. Fixation du metyrapol sur les membranes externes et internes des mitochondries et sur les microsomes de cortex surrénal.

Les membranes internes mitochondriales (0,49 mg), ou les membranes externes mitochondriales (0,28 mg), ou les microsomes (0,64 mg) sont ajoutés à du milieu salin contenant  $2,6 \times 10^{-8}$  -  $2 \times 10^{-6}$  M de  $^3\text{H}$ -metyrapol. Le volume total est 2 ml. Après 10 minutes à  $0^\circ\text{C}$ , l'incubation est stoppée par centrifugation.



## 7. FIXATION DE METYRAPOL SUR LES MITOCHONDRIES ET LES MICRO-SOMES DE FOIE DE RAT.

L'affinité du métyrapol pour les mitochondries et les microsomes de foie de rat a été mesurée. La fig. 50 montre que pratiquement aucune fixation n'est observable sur les mitochondries de foie de rat. Ceci était prévisible, car ces mitochondries ne contiennent pas de cytochrome P-450 et au moins dans la gamme de concentration utilisée (jusqu'à 5  $\mu$ M), leurs propriétés ne sont pas modifiées par le métyrapol. Par contre, les microsomes de foie de rat fixent le métyrapol, bien que dans des proportions moindres que les mitochondries de cortex surrénal. La courbe de Scatchard correspondant aux microsomes de foie de rat est montrée sur la fig. 50 B. Le tracé est non-linéaire et l'orientation de la concavité correspond à une diminution de l'affinité quand l'occupation des sites augmente. Une des interprétations les plus simples est de considérer deux types de sites d'affinités différentes et une décomposition de la courbe de Scatchard conformément à cette hypothèse est montrée sur la fig. 50 B.

## 8. FIXATION DE LA METYRAPONE SUR LES MITOCHONDRIES DE CORTEX SURRENAL.

Toutes les expériences décrites ci-dessus ont été réalisées avec le métyrapol tritié d'activité spécifique élevée : la métyrapone conduit à des résultats identiques, mais les manipulations sont moins précises en raison de la faible activité spécifique (inférieure à 7 dpm/pmole). La figure 51 montre, à titre d'exemple, la fixation de métyrapone tritiée sur les mitochondries et les microsomes de cortex surrénal.

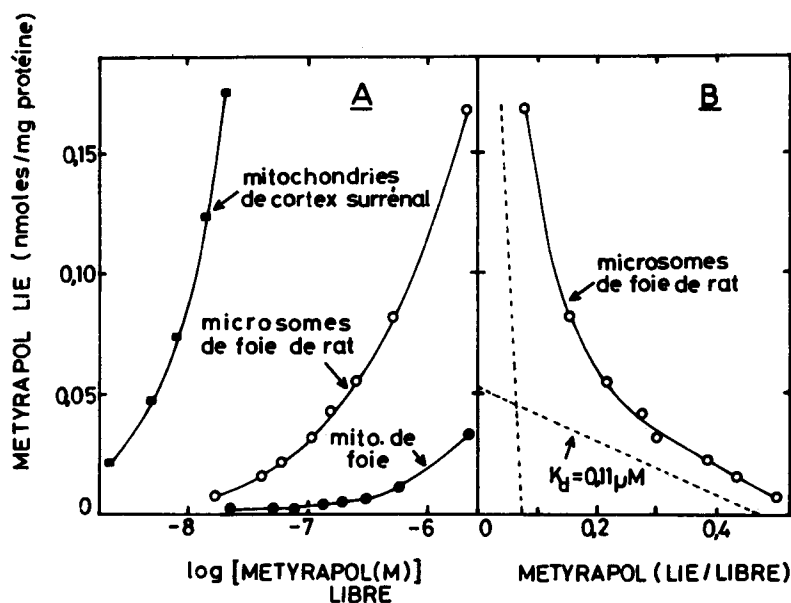


Fig. 50. Fixation du metyrapol sur les mitochondries et microsomes de foie de rat.

A - Les mitochondries (1,9 mg) ou les microsomes de foie de rat (2,1 mg) sont introduits dans du milieu salin à 0°C, pH 7,2, contenant  $2,4 \times 10^{-8}$  -  $4,8 \times 10^{-6} M$   $^3H$ -metyrapol. Le volume total est 2 ml. Après 10 minutes d'incubation à 0°C, la réaction est stoppée par centrifugation.

Dans un but comparatif, une courbe partielle ( $2,4 \times 10^{-8}$  -  $2 \times 10^{-7} M$   $^3H$ -metyrapol) de fixation du metyrapol sur les mitochondries de cortex surréal est présentée.

B - Les données de fixation du metyrapol sur les microsomes de foie de rat sont tracées selon Scatchard (118). Les lignes pointillées donnent la décomposition de la courbe dans l'hypothèse de deux classes de sites.

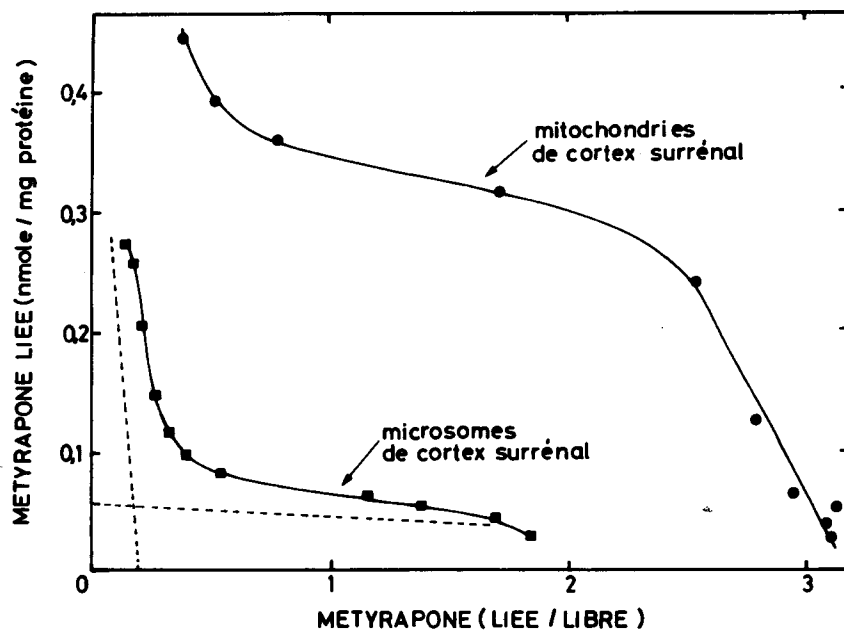


Fig. 51. Fixation de la metyrapone sur les mitochondries et les microsomes de cortex surréal de boeuf.

La fixation est mesurée à 0°C, pH 7,2, dans un milieu salin contenant  $10^{-7}$  -  $4,8 \times 10^{-6} M$   $^3H$ -metyrapone. La réaction est initiée par l'addition des mitochondries (6 mg) ou des microsomes de cortex surréal (4,1 mg). Le volume total est de 2 ml. Après 10 minutes à 0°C, la réaction est terminée par centrifugation.

A cause de la radio-activité spécifique faible, des quantités importantes de protéine sont nécessaires. Dans ces conditions, après une importante zone initiale de faible affinité, la fixation de haute affinité est observée. Le nombre maximal de sites de fixation, extrapolé à partir de la portion de courbe de forte affinité, est environ 0,4 nanomole/mg de protéine. La constante de dissociation n'est pas mesurable avec précision, elle est inférieure à  $1 \times 10^{-7}$  M. La fixation sur les microsomes de cortex surrénal est très réduite ; le nombre de sites de forte affinité est environ 0,06 nanomole/mg protéine, cette quantité de sites est explicable par la contamination mitochondriale dans les microsomes de cortex surrénal.

## 9. DISCUSSION.

Les résultats présentés montrent que les inhibiteurs de la 11 $\beta$ -hydroxylation (métyrapol et métyrapone) peuvent être utilisés sous leur forme radio-active pour des mesures directes de fixation sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf (146). Le métyrapol tritié a été principalement utilisé en raison de son activité spécifique élevée. Le métyrapol tritié permet une estimation immédiate du ligand lié et libre : c'est un avantage majeur par rapport aux titrations spectrales où habituellement seul le ligand total est connu.

L'addition de métyrapol à une suspension mitochondriale produit une interaction spectrale caractéristique, de type II (115). Le changement spectral de type II est considéré comme provenant de la formation d'un complexe avec le fer du groupe hémique (143). Les expériences de titration spectrale conduisent à une constante spectrale de dissociation élevée :  $K_S = 2,5 \mu\text{M}$  (voir également, Williamson et O'Donnell (122)). Cette surestimation est vraisemblablement provoquée par la forte affinité du métyrapol pour les mitochondries : une quantité non-négligeable de métyrapol est liée et le ligand total n'est plus voisin du ligand libre.

Une discussion de ce problème et le traitement complet des résultats optiques sont discutés par Peterson et al. (130) dans le cas du cytochrome P-450 purifié à partir des bactéries "Pseudomonas putida" cultivées en présence de camphre.

La spécificité biochimique de la fixation du métyrapol est démontrée par divers résultats.

Seuls les stéroïdes substrats du système de  $11\beta$ -hydroxylation diminuent la fixation du métyrapol sur les mitochondries de cortex surrénal. Ces mêmes stéroïdes provoquent un changement spectral de type I au niveau du cytochrome P-450 mitochondrial (116).

Dans les mitochondries de cortex surrénal, le système de  $11\beta$ -hydroxylation des stéroïdes et le cytochrome P-450 sont localisés strictement dans la membrane interne (43) (100)-(102). En accord avec cette localisation, les sites de fixation du métyrapol sont spécifiquement associés à la membrane interne ; la membrane externe ne contient qu'un nombre négligeable de sites. De même, les microsomes de cortex surrénal qui contiennent un système de 21-hydroxylation des stéroïdes associé au cytochrome P-450 insensible à la métyrapone, n'ont pas de sites de fixation pour la métyrapone et le métyrapol.

Dans les mitochondries de cortex surrénal, en plus du système de  $11\beta$ -hydroxylation, le clivage de la chaîne latérale du cholestérol est localisé dans la membrane interne (56). Ce dernier, comme la 21-hydroxylation microsomale, n'est pas inhibé par la métyrapone. Ceci doit être comparé avec la constatation que bien que les mitochondries de cortex surrénal de boeuf contiennent environ 1 nmole de cytochrome P-450/mg de protéine, le nombre maximal de sites de fixation du métyrapol ou de la métyrapone est seulement 0,4 - 0,5 nmole/mg de protéine.

Ceci peut signifier qu'une molécule de métyrapol (ou métyrapone) se combine avec deux molécules de cytochrome P-450 ou bien qu'une partie du cytochrome P-450 mitochondrial ne réagit pas avec les inhibiteurs, par exemple, le cytochrome P-450 actif dans le clivage de la chaîne latérale du cholestérol. La première hypothèse est peu vraisemblable : la cinétique d'association obéit à une loi bimoléculaire simple et de plus une stoechiométrie (1 : 1) a été démontrée pour la fixation de métyrapone sur le cytochrome P-450 bactérien purifié (130). La présence et la séparation de deux formes distinctes de cytochrome P-450 a été démontrée par divers auteurs (144) (145), la première, très liée aux membranes mitochondriales, semble spécifique de la 11 $\beta$ -hydroxylation ; une autre forme, plus facilement solubilisable serait associée au clivage de la chaîne latérale du cholestérol (20 $\alpha$ - et 22- hydroxylation). Ce dernier cytochrome peut ne pas réagir avec le métyrapol à cause d'une structure intrinsèque excluant l'inhibiteur ou bien le site de fixation peut être protégé par une concentration membranaire élevée du cholestérol mitochondrial.

Diverses hypothèses plausibles pour expliquer la région initiale de fixation de faible affinité (observée spécialement avec les quantités de protéine élevées et pour les faibles concentrations du ligand) ont été données précédemment :

- perturbation de l'équilibre de fixation du métyrapol par la présence de stéroïdes endogènes ;
- transition coopérative entre deux conformations des sites de fixation ;
- limitation de la fixation du métyrapol par une barrière de diffusion.

La première hypothèse est peu probable car les résultats obtenus montrent que les stéroïdes endogènes agissent comme des inhibiteurs compétitifs diminuant l'affinité apparente des mitochondries pour le métyrapol mais sans perturber la fixation initiale.

La seconde alternative est difficile à exclure (et à prouver) à cause de la complexité du système membranaire que nous utilisons et des expériences avec un cytochrome P-450 purifié seront sans doute nécessaires pour étudier cette question. Diverses méthodes ont été proposées pour solubiliser et purifier le cytochrome P-450 des mitochondries de cortex surrénal. A ce jour, aucune n'a fourni une protéine homogène et le facteur d'enrichissement lors de la purification est en général faible (116) (147) (148).

Burstein et al (149) ont montré que l'accès du cholestérol au cytochrome P-450 responsable du clivage de sa chaîne latérale, était limité par une barrière de diffusion. En particulier, la vitesse initiale du métabolisme du cholestérol est très augmentée par préincubation du système mitochondrial avec le cholestérol. Par analogie nous pouvons supposer qu'un tel phénomène diminue la fixation du métyrapol, la diffusion étant plus spécialement limitante aux faibles concentrations en métyrapol ; la perturbation des courbes de Scatchard est apparente dans cette zone. Cette hypothèse n'est pas invraisemblable, car le métyrapol (ou la métyrapone) sont des molécules solubles dans l'eau qui pourraient être freinées dans leur interaction avec le cytochrome P-450 mitochondrial soit au niveau de la membrane mitochondriale, soit par une structure compacte du cytochrome P-450 lui-même. Ici encore, des expériences avec une préparation purifiée de cytochrome P-450 seront nécessaires.

La métyrapone (et le métyrapol) inhibent diverses réactions d'hydroxylation associées aux microsomes de foie de rat (150)-(152), bien que des concentrations élevées ( $10^{-5}$  -  $10^{-4}$ M) soit souvent utilisées. Il a été possible de démontrer directement la présence d'un nombre réduit de sites de fixation de forte affinité pour le métyrapol sur les microsomes de foie de rat. En conformité avec les résultats enzymatiques, l'affinité du métyrapol pour les microsomes est environ dix fois plus faible que pour les mitochondries de cortex surrénal de boeuf.

En bref, la fixation du métyrapol, inhibiteur de la 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes, sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf est un processus saturable, réversible et de forte affinité. La cinétique de la réaction de fixation obéit à des lois simples et la constante de dissociation ( $K_d = 8 \times 10^{-9}$ M) calculée sur la base des constantes cinétiques d'association et de dissociation est très comparable à la valeur mesurée à l'équilibre. La signification biochimique de nos mesures directes avec le métyrapol tritié est démontrée par les résultats quantitatifs, le bon accord avec les interactions spectrales, par la spécificité cellulaire et la spécificité du site de fixation lui-même.

## CONCLUSIONS GENERALES.

L'étude de quelques propriétés des mitochondries de cortex surrénal (chapitre II) a illustré leur dualité fonctionnelle : les réactions d'une part, de synthèse d'ADP et, d'autre part, de  $11\beta$ -hydroxylation des stéroïdes associée au cytochrome P-450. Ces expériences ont confirmé les observations antérieures de Harding et al (57) et Cammer et al (64). Les mitochondries isolées de cortex surrénal de boeuf contiennent des quantités normales des cytochromes de la chaîne respiratoire et leurs propriétés respiratoires sont analogues à celles qu'on observe avec les mitochondries d'autres organes. En particulier, les mitochondries présentent le phénomène de "contrôle respiratoire" lors de la phosphorylation de l'ADP.

Les mitochondries de cortex surrénal de boeuf ont une seconde chaîne de transport d'électrons, terminée par le cytochrome P-450 et impliquée dans la  $11\beta$ -hydroxylation. Une interaction fonctionnelle entre les deux systèmes : hydroxylation et phosphorylation, est observée. Avec le malate comme substrat (ou le succinate mais dans des proportions moindres), la phosphorylation de l'ADP est inhibée lorsque de la désoxycorticostérone est présente.

Les résultats exposés dans le chapitre III montrent que les membranes externes et internes des mitochondries de cortex surrénal de boeuf peuvent être séparées et distinguées sur la base de leur morphologie et de leurs activités enzymatiques associées. La méthode de choix pour isoler des membranes externes purifiées combine un gonflement de grande amplitude et une centrifugation sur un gradient de densité, alors que les membranes internes sont obtenues dans un état de pureté plus grand par l'action sélective de la digitonine sur la membrane externe.



Ces résultats permettent de localiser le système de 11 $\beta$ -hydroxylation des stéroïdes et le cytochrome P-450 dans le compartiment membrane interne (+ matrice). L'absence de cytochrome P-450 et de système d'hydroxylation des stéroïdes dans la membrane externe sont des différences significatives entre le reticulum endoplasmique et la membrane externe mitochondriale dans le cortex surrénal de boeuf.

La fixation des substrats (désoxycorticostérone) et inhibiteurs de la 11 $\beta$ -hydroxylation (métyrapone, métyrapol) a, en général, été mesurée par spectrophotométrie différentielle. L'interprétation rigoureuse de ces interactions spectrales est complexe en raison de la quantité importante de ligand fixé, ceci apparaît, par exemple, dans l'augmentation de la constante spectrale de dissociation de la DOC avec la concentration en protéine.

Nous avons employé principalement une technique directe de fixation de la désoxycorticostérone et du métyrapol radioactifs sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf et comparé ses résultats à ceux des mesures spectrales. Elle permet d'évaluer, sans ambiguïté, les quantités de ligand lié et libre.

Dans le cas de la désocycorticostérone, sont mis en évidence un petit nombre de sites d'affinité élevée ( $N = 0,8$  nmoles/mg de protéine) ( $K_d = 10^{-6}$  M), à côté d'un grand nombre de sites non-spécifiques (partition du stéroïde entre le milieu aqueux et la membrane). Les caractéristiques des sites spécifiques sont semblables à celles qui sont observées pour l'interaction spectrale de la désoxycorticostérone. Le nombre de sites spécifiques est analogue à la valeur du cytochrome P-450 mitochondrial.

Malgré une certaine imprécision des dosages, il apparaît que le contenu mitochondrial en désoxycorticostérone plus corticostérone est très inférieur au nombre de sites de fixation de forte affinité, pour la désoxycorticostérone. Les expériences d'interaction spectrale ou directe (avec le stéroïde marqué au  $^{14}\text{C}$ ) mesurent donc réellement une fixation nette sur le cytochrome P-450 mitochondrial. Il est peu probable que le transfert de la désoxycorticostérone, entre le cytoplasme et la membrane interne mitochondriale, procède par un mécanisme d'échange -diffusion avec les stéroïdes intramitochondriaux, comme cela est connu pour le transport des anions (adénine - nucléotides, intermédiaires du cycle de Krebs). La bonne liposolubilité des stéroïdes leur permet, sans doute, d'atteindre sans restriction, une enzyme intégrée à la membrane interne mitochondriale, comme le cytochrome P-450. Ce dernier opère alors une discrimination métabolique stricte.

Le métyrapol (ou la métyrapone) se fixent avec une très forte affinité sur les mitochondries de cortex surrénal de boeuf ( $K_d = 10^{-8}\text{M}$ ). A l'inverse du stéroïde, la fixation non-spécifique est très réduite. Le métyrapol ou la métyrapone inhibent spécifiquement la fixation de forte affinité de la désoxycorticostérone radioactive. Réciproquement, la désoxycorticostérone et les stéroïdes substrats de la  $11\beta$ -hydroxylation, inhibent compétitivement la fixation de métyrapol radioactif.

Les caractéristiques de la fixation du métyrapol (spécificité, forte affinité) et la possibilité de le préparer avec une radio-activité élevée font de cette molécule un outil important pour l'étude de l'interaction de différents ligands avec le cytochrome P-450 des mitochondries de cortex surrénal. Dans une optique de purification du cytochrome P-450 mitochondrial, le métyrapol devrait-être utilisable comme ligand sur une colonne d'affinité. Les conditions précises de la synthèse d'un héli-succinate sur l'alcool en position 1 ainsi que de son couplage à une matrice de Sépharose restent à définir.

RESUME DE THESE.

1 - Les mitochondries de cortex surrénal sont capables de catalyser au moins deux réactions dans la conversion du cholestérol en corticostérone : le raccourcissement de la chaîne latérale du cholestérol et l'hydroxylation au niveau du carbone 11 de la désoxycorticostérone en corticostérone, les autres réactions de la stéroïdogénèse s'accomplissant dans le cytoplasme extramitochondrial. Ce travail concerne une analyse des interactions entre la désoxycorticostérone et la membrane mitochondriale interne où se fait la réaction d'hydroxylation. Il convenait en particulier d'élucider si la prise en charge de désoxycorticostérone par les mitochondries de cortex surrénal correspond à un transport par échange-diffusion (échange avec la corticostérone intramitochondriale) ou à une fixation nette mais spécifique de désoxycorticostérone sur la membrane interne suivie d'hydroxylation en corticostérone.

2 - Les mitochondries utilisées ont été préparées à partir de cortex surrénal de boeuf. Les membranes mitochondriales externe et interne ont été isolées après éclatement de la membrane externe consécutif à un gonflement dans un tampon phosphate hypotonique. Cette méthode est analogue à celle décrite par Parsons pour la préparation des membranes de mitochondries de foie. La purification des membranes a été suivie simultanément par des examens morphologiques en microscopie électronique et par le dosage d'activités enzymatiques caractéristiques des divers fractions submitochondriales, (monoamine oxydase pour la membrane externe, cytochrome oxydase pour la membrane interne, malate déshydrogénase pour la matrice mitochondriale).

Dans un but comparatif, d'autres méthodes de séparation des membranes mitochondriales ont été utilisées, en particulier le détachement sélectif de la membrane externe par la digitonine. Cette dernière technique permet d'obtenir des membranes internes pures mais des membranes externes très contaminées par les membranes internes.

3 - Nous avons localisé le cytochrome P-450 et le système associé de  $11\beta$ -hydroxylation dans la membrane interne des mitochondries de cortex surrénal. Ainsi contrairement aux cellules d'autres tissus où le cytochrome P-450 est présent essentiellement dans le reticulum endoplasmique, les cellules de cortex surrénal contiennent du cytochrome P-450 dans deux systèmes membranaires très nettement distincts : le reticulum endoplasmique et la membrane mitochondriale interne. Il existe donc dans la membrane interne de mitochondries de cortex surrénal deux cytochromes réactifs vis-à-vis de l'oxygène : le cytochrome P-450 et la cytochrome oxydase. Une comparaison des affinités pour l'oxygène de la cytochrome oxydase et du cytochrome P-450 a fourni les constantes de Michaelis suivantes :

$K_m = 0,27 \mu M$  pour la cytochrome c oxydase,

$K_m = 4 \mu M$  pour le cytochrome P-450.

La quantité de cytochrome P-450 par mg de mitochondries est d'environ 1 nanomole par mg de protéine, soit 7 fois plus que de cytochrome oxydase.

4 - La fixation de la désoxycorticostérone sur les mitochondries de cortex surrénal a été analysée en utilisant de la désoxycorticostérone marquée par  $^{14}C$ . La désoxycorticostérone se fixe essentiellement sur la membrane mitochondriale interne au niveau de sites de forte affinité (0,8 nmole par mg de protéine,  $K_d = 1,4 \mu M$ ) et au niveau des sites non-spécifiques de faible affinité (> 100 nmoles par mg protéine,  $K_d > 0,2 mM$ ).

Ce dernier type de fixation correspond vraisemblablement à une partition du stéroïde entre le milieu d'incubation et une phase membranaire hydrophobe. Ces tests de fixation directe entre désoxycorticostérone et mitochondries ont été comparées à des tests d'interaction spectrale portant sur les modifications du spectre du cytochrome P-450 induites par l'addition de désoxycorticostérone. Des résultats similaires sont obtenus par les deux méthodes.

5 - L'analyse par chromatographie en phase gazeuse a permis de déterminer les quantités de stéroïdes présentes dans les mitochondries de cortex surrénal de boeuf : désoxycorticostérone 0,05 nmole/mg prot.  $\pm$  20 %, corticostérone 0,11 nmole/mg prot.  $\pm$  20 %. Ces valeurs sont nettement inférieures au nombre de sites de désoxycorticostérone de forte affinité (0,8 nmole par mg). On peut en conclure que le transport de la désoxycorticostérone par un mécanisme d'échange-diffusion est peu probable, une fixation nette de désoxycorticostérone est plus vraisemblable. Etant donné

- a) l'analogie entre la quantité de cytochrome P-450 et le nombre de sites de fixation de désoxycorticostérone,
- b) les modifications spectrales immédiates du cytochrome P-450 induites par la désoxycorticostérone, on en déduit que la désoxycorticostérone se fixe sur le cytochrome P-450 dans une stoechiométrie de 1 à 1.

6 - Nous avons également analysé les interactions de la membrane interne de mitochondries de cortex surrénal avec des inhibiteurs spécifiques de l'hydroxylation de la désoxycorticostérone : le métyrapone (2-méthyl 1-2 bis (3-pyridyl)-1-propanone), et son alcool correspondant : le métyrapol. Ces inhibiteurs diminuent de façon compétitive la fixation de désoxycorticostérone sur ses sites de forte affinité ( $K_i$  = 0,3  $\mu$ M).

Nous avons mis au point une méthode de préparation de métyrapol tritié de très forte radio-activité spécifique pour l'analyse de ses caractéristiques de fixation "haute affinité". Le métyrapol se fixe avec une affinité très élevée ( $K_d = 10^{-8}M$ ), sur la membrane mitochondriale interne du cortex surrénal, le nombre de sites de fixation est de 0,5 nmole/mg protéine, c'est-à-dire du même ordre que le nombre de sites de fixation de désoxycorticostérone. La désoxycorticostérone inhibe compétitivement la fixation de métyrapol tritié ( $K_i = 1 \mu M$ ). De même, les ligands du groupe hémunique comme l'oxyde de carbone et les carbylamines, qui se fixent sur le cytochrome P-450 à la place de l'oxygène, inhibent compétitivement la fixation de métyrapol tritié.

Les mesures d'interaction spectrale confirment les données de fixation obtenues avec le métyrapol radioactif.

7 - La spécificité et la forte affinité de liaison du métyrapol pour le cytochrome P-450 mitochondrial en font un ligand intéressant pour une purification du cytochrome P-450 mitochondrial par chromatographie d'affinité. L'isolement du cytochrome P-450 mitochondrial permettrait d'aborder l'étude de ses propriétés physicochimiques ainsi que sa biogénèse et son intégration à la structure mitochondriale spécialisée du cortex surrénal.

## B\_I\_B\_L\_I\_O\_G\_R\_A\_P\_H\_I\_E

- 1 - Functions of the Adrenal Cortex. Vol I et II (1968)  
K.W. Mc Kerns, Ed. North Holland Pub. Co., Amsterdam.
- 2 - The Adrenal Cortex (1967), A.B. Eisenstein, Ed. Little,  
Brown, Co. (USA).
- 3 - KLINGENBERG, M. (1958) Arch. Biochem. Biophys. 75, 376-386.
- 4 - OMURA, T. et SATO, R. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2370-2378.
- 5 - OMURA, T. et SATO, R. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2379-2385.
- 6 - HARDING, B.W., WONG, S.H. et NELSON, D.H. (1964) Bioch.  
Biophys. Acta, 92, 415-417.
- 7 - HARDING, B.W., WILSON, L.D., WONG, S.H. et NELSON, D.H.,  
(1965) Steroids, Supp. II, 51-77.
- 8 - HARDING, B.W. et NELSON, D.H. (1966) J. Biol. Chem. 241,  
2212 - 2219.
- 9 - KIMURA, T. et SUZUKI, K. (1967) J. Biol. Chem 242, 485-491.
- 10 - OMURA, T., SANDERS, E., ESTABROOK, R.W., COOPER, D.Y. et  
ROSENTHAL, O. (1966) Arch. Biochem. Biophys. 117, 660-673.
- 11 - BROWNIE, A.C. et GRANT, J.K. (1956) Biochem. J. 62, 29-33.
- 12 - GRANT, J.K. (1956) Biochem. J. 64, 559-567.
- 13 - PERON, F.G. et TSANG, C.P.W. (1969) Biochim. Biophys. Acta  
180, 445-458.
- 14 - ANDO, N. et HORIE, S. (1972) J. Biochem. 72, 583-597.
- 15 - SIMPSON, E.R., JEFEOATE, C.R. et BOYD, G.S. (1971) FEBS  
Letters 15, 53-58.
- 16 - GRANT, J.K. (1968) J. Endocrinol. 41, 111-135.
- 17 - BRANSOME, E.D. (1968) Annual Rev. Physiol. 30, 171-212.
- 18 - MULROW, P.J. (1972) Annual Rev. Physiol. 34, 409-424.
- 19 - HOGEBOOM, G.H. (1955) "Methods in Enzymology" 1, 16-19  
Colowick, S.P. et Kaplan, N.O., Ed., Academic Press. N.Y. (USA)
- 20 - "Techniques for Electron Microscopy" (1965) Kay, D.H.,  
Ed., Blackwell, Oxford.

- 21 - SJÖSTRAND, F.S. (1967) "Electron Microscopy of Cells and Tissues" Vol. I, Academic Press, N.Y. (USA).
- 22 - PARSONS, D.F. (1967) "Methods in Enzymology", 10, 655 - 667. Estabrook, R.W. et Pullman, M.E., Ed., Academic Press N.Y. (USA).
- 23 - GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J. et DAVID, M.M. (1949) J. Biol. Chem. 177, 751-766.
- 24 - OMURA, T. et SATO, R. (1967) "Methods in Enzymology" 10, 556-561. Estabrook, R.W. et Pullman, M.E., Academic Press N.Y. (USA).
- 25 - APPELMANS, F., WATTIAUX, R. et DE DUVE, C. (1955) Biochem. J. 59, 438-455.
- 26 - YONETANI, T. et RAY, G.S. (1965) J. Biol. Chem. 240, 3392-3398.
- 27 - WURTMAN, R.J. et AXELROD, J. (1963) Biochem. Pharmacol. 12, 1439-1441.
- 28 - OTSUKA, S. et KOBAYASHI, Y. (1964) Biochem. Pharmacol. 13, 995-1006.
- 29 - SOTTOCASA, G.L., KUYLENSTIERNA, B., ERNSTER, L. et BERGSTRAND, A., (1967) J. Cell Biol. 32, 415-438.
- 30 - OCHOA, S. (1955) "Methods in Enzymology", 1, 735-739. Colowick, S.P. et Kaplan, N.O., Ed. Academic Press, N.Y (USA)
- 31 - BÄR, H.P. et HECHTER, O. (1969) Anal. Biochem. 29, 476-489.
- 32 - DUEE, E.D. (1968) Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1215-1219.
- 33 - KREBS, H.A. et HEMS, R. (1953) Biochim. Biophys. Acta 12, 172-
- 34 - VIGNAIS, P.V., DUEE, E.D., VIGNAIS, P.M. et HUET, J. (1966) Biochim. Biophys. Acta 118, 465-483.
- 35 - PORTER, C.C. et SILBER, R.H. (1954) J. Biol. Chem. 210, 923-
- 36 - PURVIS, J.L., BATTU, R.G. et PERON, F.G. (1968) "Functions of the Adrenal Cortex", 2, 1007-1055. Mc Kerns, K.W., Ed. North Holland, Amsterdam.
- 37 - SCATCHARD, G., COLEMAN, J.S. et SHEN, A.L. (1957) J. Chem. Soc., 79, 12-20.



- 38 - ROSENTHAL, H.E. (1967) Anal. Biochem., 20, 525-532.
- 39 - DANCHIN, A. et GUERON, M. (1970) European J. Biochem. 16, 532-536.
- 40 - FLETCHER, J.E. et SPECTOR, A.A. (1968) Computers and Biomed. Res. 2, 164-175.
- 41 - REICH, J.G., WANGERMANN, G., FALCK, M. et ROHDE, K. (1972), European J. Biochem. 26, 368-379.
- 42 - BAUDHUIN, P., BEAUFAY, H., RAHMAN-LI, Y., SELLINGER, O. WATTIAUX, R., JACQUES, P. et DE DUVE, C. (1963) Biochem. J. 92, 179-184.
- 43 - SOTTOCASA, G.L. et SANDRI, G. (1970) Biochem. J. 116, 16 P.
- 44 - PHILLIPS, A.H. et LANGDON, R.G. (1962) J. Biol. Chem. 237, 2652-2660.
- 45 - PALADE, G.F. (1953) J. Histochem. Cytochem. 1, 188-211.
- 46 - SJÖSTRAND, F. (1953) Nature 171, 30-32.
- 47 - ERNSTER, L. et KUYLENSTIERNA, B. (1969) FEBS Symposium 17, 5-31. Ernster, L. et Drahota, Z., Ed., Academic Press (USA).
- 48 - FAWCETT, D.W. (1966) "The Cell". W.B. Saunders Co, Philadelphia (USA).
- 49 - YAGO, N., SEKI, M., SEKIYAMA, S., KOBAYASHI, S., KUROKAWA, H., IMAI, Y., SATO, F. et SHIRAGAY, A. (1972) J. Cell Biol. 52, 503-513.
- 50 - LUFT, J. et HECHTER, O. (1957) J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 615-623.
- 51 - IDELMAN, S. (1966) Ann. Sci. Nat. Zool. 8, 205-362.
- 52 - IDELMAN, S. (1970) Intern. Rev. Cytol. 27, 181-281.
- 53 - BELT, W.D. et PEASE, D.C. (1956) J. Biophys. Biochem. Cytol., Supp. 2, 369-377.
- 54 - LEVER, J.D. (1956) J. Biophys. Biochem. Cytol. 2, 313-317.
- 55 - ALLMAN, D.W., WAKABAYASHI, T., KORMAN, E.F. et GREEN, D.E. (1970) Bioenergetics 1, 73-86.
- 56 - YAGO, N., KOBAYASHI, S., SEKIYAMA, S., KUROKAWA, H., IWAI, Y., SUZUKI, I. et ICHII, S. (1970) J. Biochem. 68, 775-783.
- 57 - HARDING, B.W., BELL, J.J., OLDHAM, S.B. et WILSON, L.D. (1968) Functions of the Adrenal Cortex 2, 831-896. K.W. Mc Kerns, Ed., North Holland, Amsterdam.

- 58 - CLARK, L.C., WOLF, R., GRANGER, D. et TAYLOR, Z. (1953) J. Appl. Physiol. 6, 189-193.
- 59 - CHANCE, B. et WILLIAMS, G.R (1956) Advances Enzymol. 17, 65-134.
- 60 - CAMMER, W. et ESTABROOK, R.W. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 122, 721-734.
- 61 - KLINGENBERG, M. (1970) European J. Biochem. 13, 247-252.
- 62 - KIMURA, T. et NAKAMURA, S. (1971) Biochemistry 10, 4517-4522.
- 63 - SCHINDLER, F.J. (1967) "Methods in Enzymology" 10, 629-634. Estabrook, R.W. et Pullman, M.E. Ed., Academic Press (USA).
- 64 - CAMMER, N. et ESTABROOK, R.W., (1968) dans "Functions of the Adrenal Cortex" 2, 943-992. Mc Kerns, K.W., Ed. North Holland Pub., Amsterdam.
- 65 - BÂRZU, O. et BORZA, V. (1967) Anal. Biochem. 21, 344-357.
- 66 - BÂRZU, O. et SATRE, M. (1970) Anal. Biochem. 36, 428-433.
- 67 - SAUER, L.A. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 149, 42-51.
- 68 - DUEE, E.D. et VIGNAIS, P.V. (1969) J. Biol. Chem 244, 3932-3940.
- 69 - OLDHAM, S.B., BELL, J.J. et HARDING, B.W. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 123, 496-506.
- 70 - CAMMER, W. et ESTABROOK, R.W. (1967) Arch. Biochem. Bioph. 122, 735-747.
- 71 - BEAUFAY, H., BENDALL, D.S., BAUDHUIN, P., WATTIAUX, R. et DE DUVE, C. (1959) Biochem. J. 73, 628-637.
- 72 - PARSONS, D.F., WILLIAMS, G.R., THOMPSON, W., WILSON, D. et CHANCE, B. (1967) dans "Mitochondrial Structure and compartmentation", Quagliariello, E., Papa, S., Slater, E.C. et Tager, J.M., Eds, Adriatica Editrice, Bari (Italie), 29-73.
- 73 - PARSONS, D.F., WILLIAMS, G.R. et CHANCE, B. (1966) Ann. N.Y Acad. Sci. 137, 643-666.
- 74 - PARSONS, D.F. et VERBOON, J.G. (1965) J. Appl. Physics 36, 2615.
- 75 - PARSONS, D.F. et WILLIAMS, G.R. (1967) dans "Methods in Enzymology" 10, 443-448.
- 76 - SOTTOCASA, G.L., KUYLIENSTIERNA, B., ERNSTER, L. et BERGSTRAND A. (1967) dans "Methods in Enzymology", 10, 448-463. Estabrook, R.W., Pullman, M.E., Eds., Academic Press (USA).

- 77 - LEVY, M., TOURY, R. et ANDRE, J. (1966) C.R. Acad. Sc. (Paris) 262, 1593-1596.
- 78 - LEVY, M., TOURY, R. et ANDRE, J. (1966) C.R. Acad. Sc. (Paris) 263, 1766-1769.
- 79 - LEVY, M., TOURY, R. et ANDRE J. (1967) Biochim. Biophys. Acta 135, 599-613.
- 80 - SCHNAITMAN, C., ERWIN, V.G. et GREENAWALT, J.W. (1967) J. Cell Biol. 32, 719-735.
- 81 - SCHNAITMAN, C. et GREENAWALT, J.W. (1968) J. Cell Biol. 38, 158-175.
- 82 - GREENAWALT, J.W. et SCHNAITMAN, C.A. (1970) J. Cell Biol. 46, 173-179.
- 83 - WHEREAT, A.F., ORISHIMO, M.W. NELSON, J. et PHILLIPS, S.J. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6498-6506.
- 84 - TELLEZ DE INON, M.T., SACERDOTE, F.L. et BURGOS, M.H. (1969) J. Microscopie 8, 615-626.
- 85 - WATANABE, H. (1971) J. Biochem. 69, 275-281.
- 86 - MEUNIER, D., PIANETA, C. et COULOMB, P. (1971) C.R. Acad. Sc. Paris, 272, 1376-1379.
- 87 - CASSADY, W.E. et WAGNER, R.P. (1971) J. Cell Biol. 49, 536-541.
- 88 - ACCOCEBERRY, B. et STAHL, A. (1972) C.R. Acad. Sc. Paris, 274, 3135-3138.
- 89 - BANDLOW, W. (1972) Biochim. Biophys. Acta 282, 105-122.
- 90 - ESTABROOK, R.W. et HOLOWINSKI, A. (1961) J. Biophys. Biochem. Cytol. 9, 19-28.
- 91 - WLODAWER, P., PARSONS, D.F., WILLIAMS, G.R. et WOJTCZAK, L. (1966) Biochim. Biophys. Acta 128, 34-37.
- 92 - MUNN, E.A. et BLAIR, P.V. (1967) Zeit. Zellforschung 80, 205-213.
- 93 - BACHMANN, E., LENAIZ, G., PERDUE, J.F., ORME-JOHNSON, N. et GREEN, D.E. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121, 73-87.
- 94 - ALLMANN, D.W., BACHMANN, E., ORME-JOHNSON, N., TAN, W.C. et GREEN, D.E. (1968) Arch. Biochem. Biophys. 125, 981-1012.

- 95 - BEATTIE, D.S. (1968) Biochim. Biophys. Res. Comm. 31, 901-907.
- 96 - SMOLY, J.M., KUYLENSTIERNA, B. et ERNSTER, L. (1970) Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 125-131.
- 97 - SMOLY, J.M., WAKABAYASHI, T., ADDINK, A.D.F. et GREEN, D.E. (1971) Arch. Bioch. Biophys. 143, 6-21.
- 98 - ADDINK, A.D.F., BOER, P., WAKABAYASHI, T. et GREEN, D.E. (1972) Eur. J. Biochem. 29, 47-59.
- 99 - VIGNAIS, P.M., NACHBAUR, J. et VIGNAIS, P.V. (1969) FEBS Symposium 17, 43-58.
- 100 - SATRE, M., VIGNAIS, P.V. et IDELMAN, S. (1969) FEBS Letters 5, 135-140.
- 101 - YAGO, N. et ICHII, S. (1969) J. Biochem. 65, 215-224.
- 102 - DODGE, A.K., CHRISTENSEN, A.K. et CLAYTON, R.B. (1970). Endocrinology 87, 254-261.
- 103 - BILLIAR, R.B., ALOUSI, M.A., KNAPPENBERGER, M.H. et LITTLE, B. (1971) Arch. Bioch. Biophys. 144, 30-50.
- 104 - PARSONS, D.F. et YANO, Y. (1967) Biochim. Biophys. Acta. 135, 362-364.
- 105 - OMURA, T., SATO, R. COOPER, D.Y., ROSENTHAL, O. et ESTABROOK, R.W. (1965) Féd. Proc. 24, 1181-1189.
- 106 - ELLIN, A., JAKOBSSON, S.V., SCHENKMAN, J.B. et ORRENIUS, S. (1972) Arch. Bioch. Biophys. 150, 64-71.
- 107 - ESTABROOK, R.W., COOPER, D.Y. et ROSENTHAL, O. (1963) Biochem. Zeit. 338, 741-755.
- 108 - GUNSALUS, I.C. et LIPSCOMB, J.D. (1972) dans "Molecular Basis of Electron Transport" 179-196. J. Schultz et B.F. Cameron, Ed. Academic Press, N.Y. (USA).
- 109 - ICHIKAWA, Y. et YAMANO, T. (1967) Arch. Biochem. Biophys. 121, 742-749.
- 110 - ESTABROOK R.W., BARON, J., FRANKLIN, M., MASON, I., WATERMAN, M. et PETERSON, J. (1972) dans "Molecular Basis of Electron Transport" 197-225. J. Schultz et B.F. Cameron, Ed. Academic Press, N.Y. (USA).
- 111 - NARASHIMHULU, S., COOPER, D.Y. et ROSENTHAL, O. (1965) Life Sci. 4, 2101-2108.
- 112 - COOPER, D.Y., NARASHIMHULU, S., SLADE, A., RAICH, W., FOROFF, O. et ROSENTHAL, O. (1965) Life Sci. 4, 2109-2144.

- 113 - SCHENKMAN, J.B., REMMER, H. et ESTABROOK, R.W. (1967) Mol. Pharmacol. 3, 113-123.
- 114 - WILSON, L.D., OLDHAM, S.B. et HARDING, B.W. (1969) Biochemistry 8, 2975-2981.
- 115 - WHYSNER, J.A. RAMSEYER, J. et HARDING, B.W. (1970) J. Biol. Chem. 245, 5441-5449.
- 116 - MITANIE, F. et HORIE, S. (1969) J. Biochem. 65, 269-280.
- 117 - MITANIE, F. et HORIE, S. (1969) J. Biochem. 66, 139-149.
- 118 - SCATCHARD, G. (1949) Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660-672.
- 119 - COOPER, D.Y., NARASHIMHULU, S., ROSENTHAL, O. et ESTABROOK, R.W. (1968) dans "Functions of the Adrenal Cortex", 2, 897-942. K.W. Mc Kerns, Ed. North Holland, Amsterdam.
- 120 - HAYANO, M. et DORFMAN, R.I. (1962) dans "Methods in Enzymology" 5, 503-512. S.P. Colowick et N.O Kaplan, Ed., Academic Press, N.Y. (USA).
- 121 - DOMINGUEZ, O.V. et SAMUELS, L.T. (1963) Endocrinology 73, 304-309.
- 122 - WILLIAMSON, D.G. et O'DONNELL, V.J. (1969) Biochemistry 8, 1306-1311.
- 123 - SPRUNT, J.G. et HANNAH, D.M. (1968) J. Endocrinol. 41, XXVI.
- 124 - EDSALL, J.T. et WYMAN, J. (1958) dans "Biophysical Chemistry" Academic Press, N.Y. (USA).
- 125 - WEBBER, J.L. (1963) dans "Enzymes and Metabolic Inhibitors", Academic Press, N.Y. (USA).
- 126 - HENDERSON, P.J.F. (1972) Biochem. J. 127, 321-333.
- 127 - WESTPHAL, U. (1971) dans "Steroid-Protein Interactions" Springer.
- 128 - GAUNT, R., STEINETZ, B.G et CHART, J.J. (1968) Clinical Pharmacol. Therapeut. 9, 657-681.
- 129 - NETTER, K.J. KAHL, G.F. et MAGNUSSEN, M.P. (1969) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 265, 205-215.
- 130 - PETERSON, J.A., ULLRICH, V. et HILDEBRANDT, A.G. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 145, 531-542.
- 131 - SIMPSON, E.R. et BOYD, G.S. (1967) European J. Biochem. 2, 275-285.

- 132 - KAHNT, F.N. et NEHER, R. (1962) *Experientia* 18, 499-504.
- 133 - BLEDSOE, T., ISLAND, D.P., RIONDEL, A.M. et LIDDLE, G.W. (1964) *J. Clin. Endocrinol.* 24, 740-746.
- 134 - OLSON, J.S. et GIBSON, Q.H. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 1713-1726.
- 135 - PHELPS, C., ANTONINI, E. et BRUNORI, M. (1972) *Biochem. J.* 128, 377-382.
- 136 - JEFEOATE, C.R.E., CALABRESE, R.L. et GAYLOR, J.L. (1970) *Molec. Pharmacol.* 6, 391-401.
- 137 - IMAI, Y. et MASON, H.S. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 5970-5977.
- 138 - GRIFFIN, B. et PETERSON, J.A. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 145, 220-229.
- 139 - ICHIKAWA, Y. et YAMANO, T. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 753-765.
- 140 - JEFEOATE C.R.E. et GAYLOR, J.L. (1970) *Biochemistry* 9, 3816-3823.
- 141 - SHARMA, D.C., FORCHIELLI, E. et DORFMAN, R.I. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 572-575.
- 142 - Mc CARTHY, J.L. et PERON, F.G. (1967) *Biochemistry* 6, 25-31.
- 143 - SCHENKMAN, J.B. (1970) *Biochemistry* 9, 2081-2091.
- 144 - ISAKA, S. et HALL, P.F. (1971) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 43, 747-753.
- 145 - JEFEOATE, C.R.E., HUME, R. et BOYD, G.S. (1970) *FEBS Letters* 9, 41-44.
- 146 - SATRE, M., LUNARDI, J. et VIGNAIS, P.V. (1972) *FEBS Letters* 26, 193-196.
- 147 - YOUNG, D.K., HOLROYD, J.D. et HALL, P.F. (1970) *Biochim. Biophys. Res. Comm.* 38, 184-190.
- 148 - SCHLEYER, H., COOPER, D.Y. et ROSENTHAL, O. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6103-6110.
- 149 - BURSTEIN, S., DINH, J., CO, N., GUT, M., SCHLEYER, H., COOPER, D.Y et ROSENTHAL, O. (1972) *Biochemistry* 11, 2883-2891.
- 150 - LEIBMAN, K.C. (1969) *Molec. Pharmacol.* 5, 1-9.

- 151 - LEIBMAN, K.C. (1971) Chem. Biol. Interactions 3, 289-290.
- 152 - HILDEBRANDT, A.G., LEIBMAN, K.C. et ESTABROOK, R.W. (1969) Biochem. Biophys. Res. Comm. 37, 477-485.
- 153 - SATRE, M., VIGNAIS, P.V. et IDELMAN, S. (1969) FEBS Letters 5, 135-140.
- 154 - SATRE, M., CHAMBAZ, E.M., VIGNAIS, P.V. et IDELMAN, S. (1971) FEBS Letters 12, 207-212.
- 155 - HILDEBRANDT, A.G. (1972) dans "Biological Hydroxylations" 79-102. G.S. Boyd et R.M.S. Smellie, Ed., Academic Press, N.Y, USA.
- 156 - SCHLEYER, H., COOPER, D.Y., LEVIN, S.S. et ROSENTHAL, O. (1972) dans "Biological Hydroxylations", 187-206. G.S. Boyd et R.M.S. Smellie, Ed., Academic Press, N.Y USA.